生命科学实验指南系列

蛋白质电泳实验技术（第二版）

郭尧君 编著

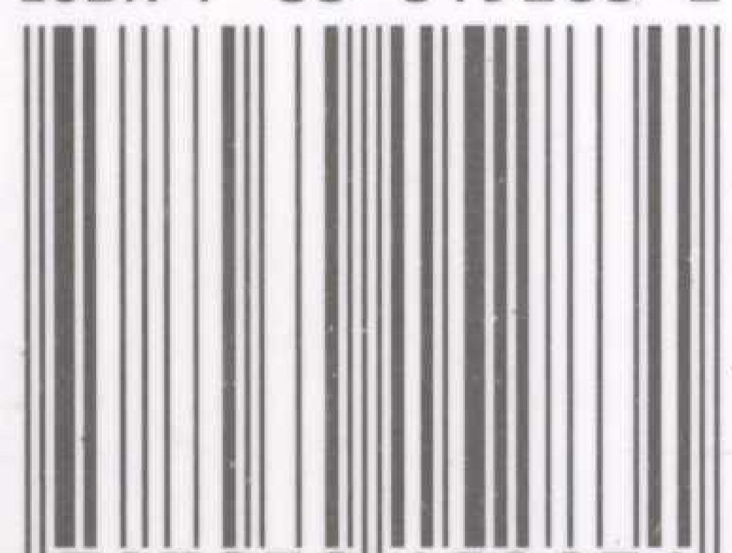


科学出版社
www.sciencep.com

(Q-1574.0102).

蛋白质电泳实验技术

（第二版）


ISBN 7-03-015283-2

9 787030 152831 >

销售分类建议：生物医学／生物技术／生物化学

生命科学编辑部
联系电话：010-64012501
http://www.lifescience.com.cn
e-mail：spbio@163.net

ISBN 7-03-015283-2
定价：38.00元

生命科学实验指南系列

蛋白质电泳实验技术

(第二版)

郭尧君 编著

科学出版社

北京

内 容 简 介

本书从介绍凝胶电泳的原理、电泳实验技术的发展简史和各种现代的电泳设备入手，重点阐述了9种蛋白质电泳技术的原理、方法、实验考虑和具体应用。为了满足蛋白质组学研究的需要，本版特别对双向电泳及其相关技术进行了详细介绍。本书是作者40多年研究成果的总结，其指导性、实用性、可操作性很强，是一本非常好的电泳工具书。

本书适用于生命科学实验室工作人员及相关领域的大专院校师生。

图书在版编目（CIP）数据

蛋白质电泳实验技术/郭尧君编著.—2版.—北京：科学出版社，2005
（生命科学实验指南系列）
ISBN 7-03-015283-2

Ⅰ.蛋… Ⅱ.郭… Ⅲ.蛋白质-凝胶电泳-技术 Ⅳ.Q510.3

中国版本图书馆CIP数据核字（2005）第040410号

责任编辑：马学海　李　悦/责任校对：包志虹
责任印制：钱玉芬/封面设计：王　浩

科学出版社 出版
北京东黄城根北街16号
邮政编码：100717
http://www.sciencep.com
新蕾印刷厂 印刷
科学出版社发行　各地新华书店经销

*

1999年2月第一版　开本：B5（720×1000）
2005年5月第二版　印张：18 3/4
2006年1月第六次印刷　字数：353 000
印数：15 101—18 100

定价：38.00元

（如有印装质量问题，我社负责调换〈环伟〉）

Preface 1

Proteomics represents an exciting new way to pursue biological science at an unprecedented pace. Proteomics works as a broad, comprehensive, systematic approach to understanding biology. In contrast to genomics, proteome analysis is technically much more challenging, because the number of different proteins at a given time under defined biological conditions is likely to be in the range of several thousand for simple procaryotic organism, and up to at least 10,000 in eucaryotic cell extracts. In spite of promising alternative/complementary technologies (e.g., MudPIT, stable isotope labeling, protein arrays) that have emerged recently, two-dimensional electrophoresis is currently the only technique that can be routinely applied for parallel quantitative expression profiling of large sets of complex protein mixtures such as whole cell lysates. Hence, two-dimensional gel electrophoresis with immobilized pH gradients combined with protein identification by mass spectrometry is currently the work horse for proteomics.

The spectrum of analytical possibilities has become so varied that an overview of electrophoretic separation methods seems desirable not only for beginners but also for experiencd users. Professor Guo Yaojun's comprehensive book on experimental techniques in protein electrophoresis has been written for this purpose.

I met Professor Guo Yaojun on different seminars, congresses and tutorials from 1980, and was always fascinated by her spirited lectures and impressed by her profound expertise on all kind of electrophoretic techniques. Her book benefits from her long-lasting experience in this field and has become a highly appreciated standard reference source for biochemical and biomedical students.

Angelika Görg

Prof. Dr. Angelika Görg
Technical University of Munich (Germany)
October 2004

序一

蛋白质组学这种振奋人心的新方法使人们能够以前所未有的速度从事生命科学研究，让人们在广泛、全面而又系统的层次上了解生命科学。相对于基因组学来说，蛋白质组学分析在技术上更具有挑战性，因为在一个限定的生物环境中，一定时间里的不同蛋白质数目即使在简单的原核生物中就可能数以千计，在真核细胞抽提液中就至少在一万种以上。尽管近来出现了一些有前途的、可选择的（补充性的）技术（如多维蛋白鉴定技术、稳定同位素标记技术、蛋白质芯片技术），双向电泳目前仍然是常规应用的，对于像全细胞溶解物那样复杂的大量蛋白质混合体系进行平行定量描述的惟一方法。因此，以固相 pH 梯度等电聚焦为第一向的双向凝胶电泳技术与蛋白质质谱分析技术的联合应用目前是蛋白质组学中的主要技术。

分析方法的多样性使得电泳分离方法的综述性著作无论对于初学者还是熟练者都显得尤为必要。郭尧君教授编写了这本全面讲述蛋白质电泳实验技术的专著正是出于这个目的。

从 1980 年以来，我在各种不同的讲座、学术会议和研讨班上见到郭尧君教授，总是为她极富感染力的演讲以及在各种电泳技术上渊博的专业知识所倾倒和折服。她的书来源于她在本领域长时间经验的积累，对于生物化学和生物医学方面的学生来说，这本书是一本具有极高价值的标准参考书。

德国　慕尼黑技术大学

Dr. Angelika Görg 教授

2004 年 10 月

Angelika Görg 博士、教授是国际电泳学会理事，德国电泳学会主席。建立了“以固相 pH 梯度等电聚焦为第一向的双向电泳技术（*Nature*，1991）”等。为此，1993 年在挪威举行的国际电泳年会上，英国皇家电泳学会授予她“双向电泳皇后”的称号。

Preface 2

I have been associated with Prof. Guo Yaojun for so many years that I have difficulties in remembering when I first met her. It was probably in Bromma (a suburb of Stockholm), Sweden, perfectioning her skills in isoelectric focusing. We met then again in occasion of our first Grand Tour of China, in 1983, spreading the Gospel of electrophoresis. She was my gracious host in Beijing and introduced me to the wonders of the great Chinese civilization. It was with her that I toured for the first time the Great Wall, the Temple of Heaven, the Forbidden City and this was truly an adventure, considering that very few foreigners were admitted into China in those days. We met again in other occasions, organizing lectures and workshops around China and she was always present and ready to help and translate our obscure words into more comfortable Chinese language. She must have toured China so extensively, organizing lectures and workshops in electrophoresis, as to be probably the most popular figure in today's Chinese Separation Science. I suspect that, out of so much capillary knowledge, must have born this idea of writing such a comprehensive book in all aspects of electrophoresis. Originally, I remember she approached me with the idea of translating in Chinese my two books in conventional isoelectric focusing and immobilized pH gradients, but I think she was wise in preparing instead a full meal on all aspects of electrophoresis. I now realize my fundamental mistake in writing my two books in English: as my friend Werner Von Braun (the one who brought the man to the moon with his pestiferous rockets) once warned me, I should have learned Chinese!

Piergiorgio Righetti

Prof. Pier Giorgio Righetti
University of Verona (Italy)
October-29-1998

序 二

我与郭尧君教授交往有很多年了，已经很难记得与她初次相识的时间，可能是在Bromma（瑞典，斯德哥尔摩的郊区）。在那里，我见识到了她完美的等电聚焦实验技术。在1983年，我第一次访问中国做电泳技术交流期间我们再次相遇，她作为热情的东道主向我介绍伟大的中国文化古迹，在她的陪同下我第一次参观了长城、天坛、紫禁城，在当时只有极少数外国人进入中国的情况下，这可以说是一次真正意义的探险。我们还在中国各地组织的学术讲座期间相遇，她总是出席并把我们晦涩的词汇翻译成动听的中国语言。她在中国各地组织讲座和学习班，使得电泳技术成为目前中国在分离科学上最普及的技术。我想只有在对电泳技术洞察入微的基础上才能有撰写这样一本全面讲述电泳技术的书的想法。起初，她告诉我她想把我的两本关于等电聚焦和固相 pH 梯度的书翻译成中文，但是我想以她的聪明才智完全可以撰写一本全面讲述电泳的书来代替上述想法。现在我终于认识到我用英文写我的书的根本性错误了：就像我的朋友 Werner Von Braun（第一个用他的火箭把人送上月球的人）曾经告诫我的一样：我应该学习汉语!

意大利　Verona 大学

Pier Giorgio Righetti 教授

1998 年 10 月 29 日

Pier Giorgio Righetti 博士、教授是国际电泳学会理事，意大利电泳学会主席。著有“*Isoeletric Focusing*：*Theory*，*Methodology and Applications*”（等电聚焦：原理、方法和应用）和“*Immobilized pH Gradients*：*Theory and Methodology* ”（固相 pH 梯度：原理和方法）两本重要专著。基于他对等电聚焦技术的贡献，1997 年在美国西雅图举行的国际电泳年会上，英国皇家电泳学会给他授了奖。

再版序

10年前，同行们给予我的支持、鼓励和力量，让我圆了写这本书的梦。10年来，你们对本书的关注、认可和厚爱使之4年内，4次重印共计10 600册。你们口头和书面的赞赏，让我深深感动。你们就像冬日里的阳光温暖着我，让我体味生命的充实与价值。我和我的亲人谢谢你们，由衷地感谢你们。因为你们不仅丰富了我的知识积累，还给了我生活的勇气和力量。尽管我们未曾相识，但电泳技术使我们心心相通。我愿像“聚丙烯酰胺，琼脂糖”一样为您泳向科学殿堂的宝座铺路。如果因为我的书而让您有所收获，便是我最大的欣慰。

生命科学的发展离不开实验技术的支持，人类基因组课题的提前完成，其主要原因之一是技术革新。20世纪八九十年代蛋白质电泳技术一度陷入低谷，现在蛋白质组学研究给蛋白质电泳技术带来了新的机遇、新的挑战、新的应用。双向电泳以它特有的高分辨率、高信息量成为蛋白质组学研究的首选技术之一。说来也巧，1979年我作为访问学者被中国科学院生物物理所派遣去瑞典LKB公司所做的课题正是“双向电泳技术”。90年代初我向Prof. Görg多次学习并首先在国内推广了以固相pH梯度等电聚焦为第一向的双向电泳技术，为促进我国蛋白质组学研究尽快发展迈出了第一步。

做（实验）、讲（课）和写（书）是我事业人生的全部内容。实验让我忘却一切，讲台让我兴奋、激动，写书让我在技术世界中静静地畅游。我的前半生主要从事光谱技术研究。我最喜欢荧光技术，因为它光彩夺目、灵敏度高、应用普遍。我的第一本书写的就是这种技术。后半生阴差阳错从事电泳技术研究，其中我最喜欢等电聚焦，因为它分辨率高、技术难度大、是双向电泳的关键技术。看到我最喜欢，并为此付出一生心血的两种技术现在结合在一起成为蛋白质组学研究的有力工具，我很高兴。

横坐标（等电点）：热情、勤奋、认真。纵坐标（分子质量）：荧光电泳匠。这就是我，一个做了一辈子技术研究的女科技工作者。

中国科学院生物物理研究所
郭尧君
2004年9月28日，中秋夜

序

在这些年来的准备和酝酿之后，在这中秋佳节之夜，我决心开始再度圆我的梦——继《荧光实验技术》、《分光光度实验技术》等10本著作后，奉献我这15年来在电泳技术中的各种成功与失败的小结。在将近200次的电泳讲座中，同行们给予了我那么多的支持、鼓励，甚至是赖以生存的力量。希望这本小册子能作为对大家的答谢，也作为对这世界上最爱我的妈妈的回报，还作为给女儿的礼物，希望这些实践对她有用。

在我开始闯入电泳领域后，我崇拜的居里夫人的名言一直伴随着我，那就是"科学的探讨研究其本身就含有至美，其本身给人的愉快就是酬报，所以我在我的工作里寻得了快乐。"是的，30年来，我在这五彩缤纷的光谱世界和你追我赶的电泳世界里寻得了快乐和生活的力量，我找到了我的"等电点"位置，吸收着和发射着我自己的光彩。

郭尧君

1994．9．28

编写本书的消息传出后，同行们以极大的热情来电来函关注着编写的进展。由于1995年筹备大型研讨会和筹建"Pharmacia Biotech Centre of Excellence"不得不中断了将近两年。在大家的鼓励和支持下，现在终于脱稿，在此表示深深的感谢。由于水平有限，缺点和错误在所难免，诚恳欢迎您批评指正。

中国科学院生物物理研究所

郭尧君

1998.4.16

目 录

第1章 电泳概论

什么是电泳？我想借用著名瑞典物理化学家，诺贝尔奖获得者 Arne Tiselius 1959 年为 *Electrophoresis Theory*, *Methods and Applications*[1]一书所写的序中的定义——电泳是指荷电的胶体颗粒在电场中的移动。

在离子移动的物理化学理论中，按照 Debye-Hückel 的理论，电泳决定于环绕每个离子的离子雰中的扩散双电层。当离子的尺寸越大，溶液的离子强度越高时，这种电泳现象就变得越明显。所以电泳现象中的表面电势和双电层的因素起着决定性的作用。Picton 和 Linder[2,3]、Hardy[4,5,6]、Ellis[7]和 Powis[8]的早期研究证明了这一点。Hardy[4,5,6]发现，许多生物胶体，如蛋白质、酶等有特征的电泳迁移率（electrophoretic mobility）。此迁移率在很大程度上取决于溶液的 pH。因此利用这种电泳特征作为对物质的鉴定引起人们广泛的兴趣。特别在那个时候，关于蛋白质和酶的化学本质和物理性质还知道得不多。此后，电泳不仅是一种现象，而且作为一种技术方法得到不断发展。从界面分离到各种区带电泳，开辟了混合物的电泳分析的可能性。由于电泳性质的高度特异性，甚至用结晶纯化的样品也可在电泳分析中分出两条或更多的电泳带。又由于电泳方法的温和性，对不稳定的生物大分子的分离纯化有时比其他分离技术如沉淀、离心、层析等更为方便、可靠，甚至可用作为具有一定规模的制备方法。

Tiselius 教授[1]在他的序中最后提到：“电泳方法的发展及其应用是物理方法在生物化学和生物学问题的应用中的一个具有成果的不平常的范例。希望将来的发展是由不同科学领域间密切合作而获得益处”。尽管很多工作仍待进行，但电泳鼻祖的这段结论与希望正在得到证实和实现，如荧光技术与电泳技术的结合就是一例。

1.1 电泳的早期历史

1809 年，俄国物理学家 Reüss[9]进行了世界上第一次电泳实验。他用两根玻璃管插入一块湿黏土中，容器中灌满水，管底放一层沙，然后封闭起来并通电。其结果是连接阳极的管中的水由于胶体黏土颗粒通过沙层的电泳迁移而变得混浊，而连接阴极的管中的水变得清澈，并且增加了体积，显示了电渗透现象。这个早期实验为电泳理论和技术的发展及其应用奠定了基础。

1816 年 Porrett[10]在电泳实验中首次使用荷电的膜蛋白，为电泳在生物学中的应用打开了大门。在同一世纪，Hardy[4]报道了带有负电的变性卵白蛋白可以

通过加酸而变成带正电，增加酸的浓度至迁移率变成零时的 pH 即为等电点，揭示了这些颗粒具有两性表面。Quincke[11]证实了带电颗粒在电场中的迁移与电位梯度成线性关系。Helmholtz[12]和 Smoluchowski[13]则用复杂的公式计算认为这些颗粒具有光滑的表面和不均匀的电荷分布。

首先使用 V 型槽和 U 型管槽的是 Picton 和 Linder[2,3]。他们研究了 As_2S_3、虫胶片（shellac)、高铁水合物、血红蛋白和一些胶体颗粒的电流方向和酸碱特性的相互关系。通过电流方向的变化证实了它们的两性现象的可逆性。1909 年 Michaelis[14]把胶体离子在电场中的迁移定名为“电泳”。他在 U 型管槽中通过在不同 pH 的迁移速度测定了转移酶和催化酶的等电点，甚至想纯化这些物质，但在当时未能实现。Abramson[15]和 Michaelis 一起[16]用多个实验观察了由蛋白质膜包裹的显微颗粒的尺寸、形状和方向对电泳迁移率的影响。他们发现，即使它们在形状、尺寸上有很大的变化，也不能观察到电泳迁移率的差别，但电泳对检测病毒、细菌、精子、细胞表面的生物处理或化学处理所引起的变化是一个很灵敏的技术。经突变或化学处理颗粒的表面，其电荷密度的不同用显微镜或移动界面电泳法都能被分辨。

20 世纪的 20 年代和 30 年代，电泳理论和实践有了很大的发展。瑞典乌普萨拉（Uppsala）大学的物理化学教授 Svedberg 和他的同事 Jette[17]、Scott[18]利用在长波紫外光激发时蛋白质发绿色荧光的现象，在电泳过程中，对卵白蛋白进行照相。考虑到荧光污染和需要长时间曝光的困难，Svedberg 教授和他的学生 Tiselius[19]使用了光学方法观察卵白蛋白的电泳迁移过程，以便直接测量感光板上电泳带的迁移距离。以后这个装置又由 Tiselius 教授修改[20]（见图 1.1)。他用这个装置首先证明了血清是由白蛋白，α、β 和 γ 球蛋白组成的[21]。为此他在 1948 年荣获了诺贝尔奖。自由移动界面电泳方法是用一个 U 形玻璃管作为电泳槽（见图 1.2)，在 U 形管的下面部分放胶体溶液，如蛋白溶液。U 形管的管臂连接到电极上，这样在已知电位梯度的影响下，缓冲系统中蛋白质界面的移动就能被观察到。Tiselius 把 U 形管分成几个部分，每个部分填以研碎的玻璃珠(ground glass joints)。当一定组分的蛋白质移到 U 形管的特定位置时，此组分就被分离。Tiselius 装置中最重要的改进是利用叫做“纹影法”（schlieren）或“阴影照相法”（shadow）来观察蛋白质界面的移动。当光束通过一个具有不同折射指数的两种液体的界面时，光就被折射到具有比较大折射指数的液体侧。蛋白质和缓冲液具有不同的折射指数，并且这种差异与蛋白质浓度成比例，因此蛋白质和缓冲液的界面将是不透明的，界面的位置就能呈现一条黑带而准确地定位在玻璃底板上。虽然纹影黑带的垂直宽度是与蛋白质浓度成正比，但在那时还不能准确计算蛋白质的浓度。为了准确定量，以后又由 Philpot[22]和 Svensson[23]改进为圆柱形透镜系统和 Long-sworth[24,25]的扫描方法。

人血清蛋白用界面移动方法分离的最佳条件是 0.1mol/L（pH 8.6）的巴比

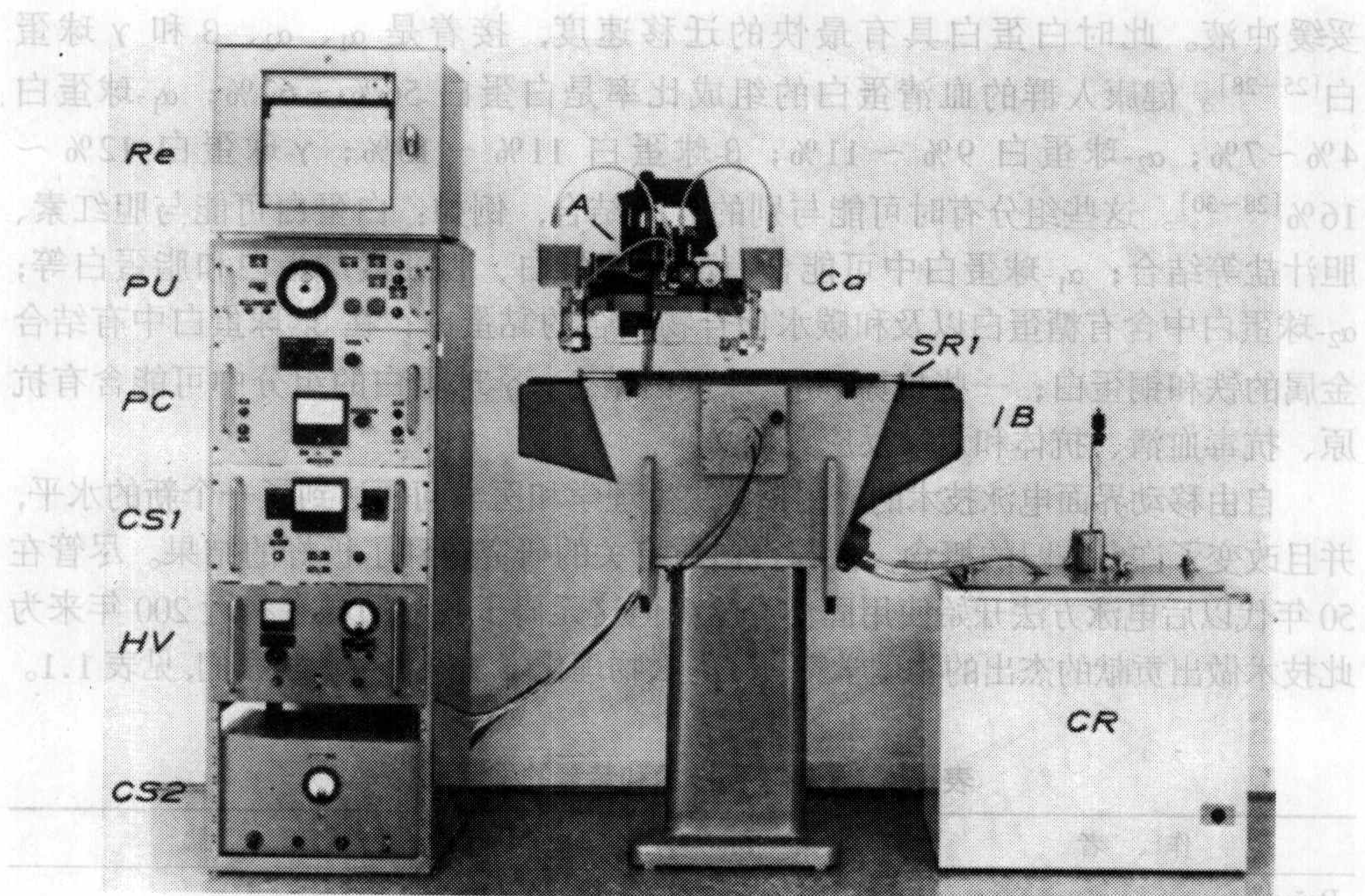


图 1.1　诺贝尔奖获得者 Tiselius A 的自由移动界面电泳仪[20]

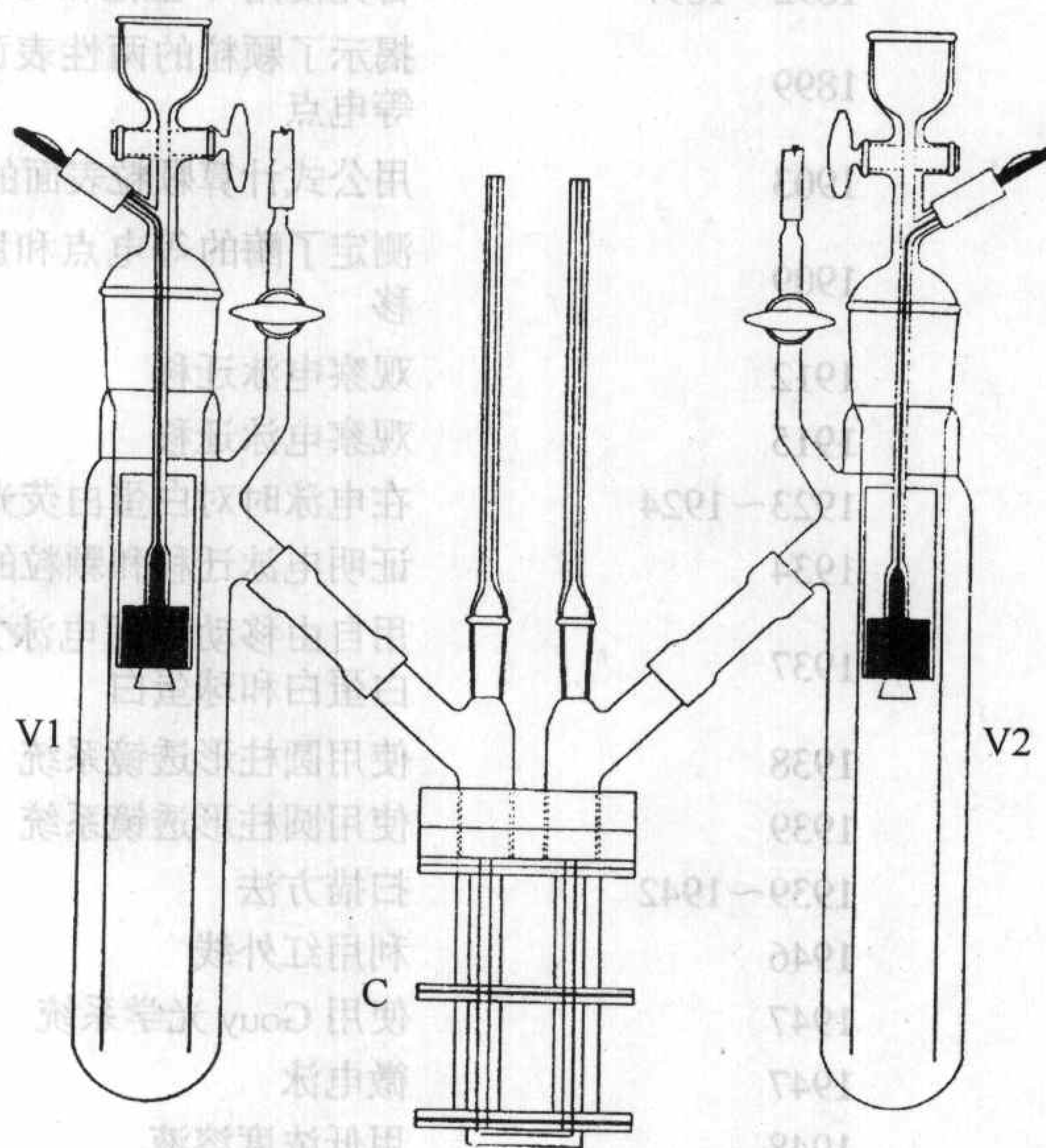


图 1.2　Tiselius 电泳槽(C)和电极(V1和 V2)[21]

妥缓冲液。此时白蛋白具有最快的迁移速度，接着是 α_1、α_2、β 和 γ 球蛋白[25~28]。健康人群的血清蛋白的组成比率是白蛋白 56%～62%；α_1-球蛋白 4%～7%；α_2-球蛋白 9%～11%；β-球蛋白 11%～15%；γ-球蛋白 12%～16%[28~30]。这些组分有时可能与别的分子结合，例如：白蛋白可能与胆红素、胆汁盐等结合；α_1-球蛋白中可能含有酸性糖蛋白、胆红素球蛋白和脂蛋白等；α_2-球蛋白中含有糖蛋白以及和碳水化合物结合的黏蛋白；在 β_1-球蛋白中有结合金属的铁和铜蛋白；一些抗原和 β_2-球蛋白结合；γ-球蛋白的组分中可能含有抗原、抗毒血清、抗体和过敏反应素等。

自由移动界面电泳技术的应用使解决生理学和医学问题达到了一个新的水平，并且改变了许多陈旧的概念，使与蛋白质有关的研究得到了极好的结果。尽管在50年代以后电泳方法开始使用固体介质，但这无碍于我们回顾在将近200年来为此技术做出贡献的杰出的物理学家、化学家、物理化学学家和生理学家们，见表1.1。

表1.1　早期电泳技术和装置的发展历史

作　者	年　份	贡　　献
Reŭss[9]	1809	第一次电泳实验
Porrett[10]	1816	首次使用荷电的膜蛋白
Quincke[11]	1861	证实带电颗粒的迁移与电位梯度成线性关系
Helmholtz[12]	1879	用公式计算颗粒表面的电荷分布
Picton 和 Linder[2,3]	1892～1897	首先使用 V 型池和 U 型管池
Hardy[4]	1899	揭示了颗粒的两性表面和测定了卵白蛋白的等电点
Smoluchowski[13]	1903	用公式计算颗粒表面的电荷分布
Michaelis[14]	1909	测定了酶的等电点和胶体离子在电泳中的迁移
Ellis[7]	1912	观察电泳迁移
Powis[8]	1915	观察电泳迁移
Svedberg[17,18]	1923～1924	在电泳时对白蛋白荧光照相
Abramson[15,16]	1934	证明电泳迁移和颗粒的形状和尺寸无关
Tiselius[21]	1937	用自由移动界面电泳方法将血清分离成血清白蛋白和球蛋白
Philpot[22]	1938	使用圆柱形透镜系统
Svensson[23]	1939	使用圆柱形透镜系统
Longsworth[24,25]	1939～1942	扫描方法
Longsworth[31]	1946	利用红外线
Kegeles 和 Gosting[32]	1947	使用 Gouy 光学系统
Labhart 和 Staub[33]	1947	微电泳
Coulson 等[34]	1948	用低浓度溶液
Moore 和 White[35]	1948	使用折叠光学系统
Lotmar[36]	1949	微电泳
Reiner 等[37]	1950	使用折叠光学系统

1.2 电泳的简单原理及分类

生物大分子如蛋白质、核酸、多糖等常以颗粒分散在溶液中，它们的净电荷取决于介质的 H^+ 浓度或与其他大分子的相互作用。在电场中，带电颗粒向阴极或阳极迁移，迁移的方向取决于它们带电的符号，这种迁移现象即电泳。迁移的方式目前可以分为三类：根据分子尺寸大小和形状、分子所带的电荷或分子的生物学与化学特性。

如果把生物大分子的胶体溶液放在一个没有干扰的电场中，使颗粒具有恒定迁移速率的驱动力来自于颗粒上的有效电荷 Q 和电位梯度 E。它们与介质的摩擦阻力 f 抗衡。在自由溶液中，这种抗衡服从斯托克斯定律（Stokes' Law）：

$$f = 6\pi r v \eta$$

这里 v 是在介质黏度为 η 中半径为 r 的颗粒的移动速度。但在凝胶中，这种抗衡并不完全符合斯托克斯定律。f 还取决于介质中的其他因子，如凝胶厚度、颗粒尺寸，甚至介质的电内渗等[38]。

电泳迁移率（mobility）μ 定义为在电场强度 E 的影响下，颗粒在时间 t 中的迁移距离 d：

$$\mu = \frac{d}{t \cdot E}$$

或

$$\mu = V/E$$

这个参数的单位是 $cm^2 \cdot s^{-1} \cdot V^{-1}$。它的符号决定于颗粒的净电荷。迁移率的不同提供了从混合物中分离物质的基础，迁移距离正比于迁移率。但在不同实验中，迁移距离或迁移率的比较只能在 t 和 E 都相同的条件下才能进行。理想的情况是如果其他条件都相同，则第二个实验用第一个实验的双倍电压和一半时间时，迁移距离 d 应该相等，但实际上只可能是大致相等，因为还有其他因素的干扰，如由于增加电压而产生的热等影响。但是这两个因子的乘积可用于很快地寻找电泳分离的最佳条件。所以电泳的电源采用“伏·小时”而不单纯采用“小时”作为电泳参数是可取的。

电场强度 E、电流密度 J 和导电性 K 有关，所以带电颗粒的移动速度也能表示为：

$$V = E \cdot m = m \cdot J/K$$

大部分的生物大分子都有阳离子和阴离子基团，称为两性离子。这些基团的解离常数不同，所以大分子的净电荷取决于环境的 pH。且其 pH 将影响分子的迁移率。离子强度则决定了大分子颗粒的电动电位，带电颗粒的迁移率与离子强度的平方根成反比。低离子强度时，迁移速率快。高离子强度时，迁移速率慢，

但电泳谱带要比低离子强度时细窄[38]。缓冲液的 pH 和离子强度的选择是很重要的，它们对电泳参数的设置考虑将起关键的作用，对电泳的结果也有很大的影响。

电泳是离子在电场中通过介质的移动，但以上讨论的一些因子都将影响各种形式的电泳。不管是在自由溶液中的移动界面电泳或有支持介质（如淀粉、聚丙烯酰胺、醋酸纤维素、纸）的电泳，特别在用支持介质时，有更多的因素影响迁移率和分离带的细窄程度，包括支持介质的吸附效应、材料的不均一性以及支持介质分子本身带电基团的离子交换和电内渗等。

从以上可以看到电泳的基本原理是很简单的，但是由于带电颗粒在通电的介质中迁移要受很多因素的制约而变得复杂。但也正因为这些不同因素的制约，能使电泳技术应用于不同的研究中。如分子的大小是一个重要影响因素，所以 SDS 电泳能用于测定生物大分子的亚基分子质量。再如阴离子基团和阳离子基团的平衡使分子的净电荷等于零，据此用等电聚焦技术可以分离不同等电点的蛋白质。所以根据电泳的原理和影响因素可以设计不同的电泳方法以达到预期的目的。

原则上按电泳的原理来分，现在有三种形式的电泳分离系统：即移动界面电泳（moving boundary electrophoresis）、区带电泳（zone electrophoresis）和稳态电泳（steady state electro-phoresis）或称置换（排代）电泳（displacement electrophoresis）。

在自由移动界面电泳中，电场加在大分子溶液和缓冲溶液之间的一个非常窄的界面上。带电分子的移动速率通过观察界面的移动来测定。如果大分子的离子溶液是不均一的，就能观察到多个移动的界面。缓冲液的选择是很重要的，它必须与大分子的离子溶液形成鲜明的界面。要准确测量界面的移动，还必须使界面两边的电场和 pH 大体恒定，电泳过程中在电极上不产生气泡，而电泳过程中产生的焦耳热借助对流循环可以不扰动界面。对界面的移动需备有观察和照相设备。图 1.2 所示的 Tiselius 电泳槽正是进行自由移动界面电泳的最理想的设备。虽然这个设备已成为历史，但 Tiselius 的设计思想仍然为现在的毛细管电泳和空间电泳所沿用。

区带电泳是在半固相或胶状介质上加一个点或一薄层样品溶液，然后加电场，分子在支持介质上或支持介质中迁移。支持介质的作用主要是为了防止机械干扰和由于温度变化以及大分子溶液的高密度而产生的对流。但是支持介质有时会吸附不同分子或起分子筛作用（层析效应）而对分离起破坏或帮助的作用。区带电泳使用不同的支持介质，早期有滤纸、玻璃珠、淀粉粒、纤维素粉、海砂、海绵、聚氯乙烯树脂；以后有淀粉凝胶、琼脂凝胶、醋酸纤维素膜，现在则多用聚丙烯酰胺和琼脂糖凝胶。

20 世纪 80 年代末发展起来的毛细管电泳（capillary electrophoresis）是一种新型的区带电泳方法，又称毛细管区带电泳（capillary zone electrophoresis）。它

是在毛细管中装入缓冲液，在其一端注入样品，在毛细管两端加直流高电压实现对样品的分离，分离后的样品依次通过设在毛细管一端的检测器检出。

稳态电泳或称置换电泳的特点是分子颗粒的电泳迁移在一定时间后达到一个稳态。在稳态达到后，带的宽度不随时间而变化，等电聚焦和等速电泳基本属于这一类[39]。

1.3 凝胶电泳技术的历史

从19世纪初到20世纪中的150年中，早期电泳技术虽然得到了发展，但从20世纪50年代后，使用凝胶作为支持介质的电泳技术得到了更快的发展和应用。特别是近年来由于蛋白质组学技术的需要，以固相pH梯度等电聚焦为第一向的双向电泳技术的发展更是突飞猛进。见表1.2。

表1.2 凝胶电泳技术的发展历史

作者	年份	内容
Svesson[40]	1948	提出pH梯度理论
Grabar和Williams[41]	1953	免疫电泳
Kolin[42~45]	1954～1958	人工pH梯度
Raymond和Weintraub[46]	1959	使用聚丙烯酰胺作为电泳支持介质
Svesson[47]	1961	载体两性电解质的理论基础
Hjertén[48]	1962	T和C的计算公式
Hjertén[49]	1963	不连续电泳
Fazekas等[50]	1963	考马斯亮蓝染色(用于纸、琼脂等)
Orenstein[51]	1964	不连续电泳
Davis[52]	1964	不连续电泳
Vesterberg[53]	1964	合成载体两性电解质
Ferguson[54]	1964	Ferguson作图法(用于淀粉凝胶)
Meyer等[55]	1965	考马斯亮蓝染色(用于聚丙烯酰胺凝胶)
瑞典LKB公司[56]	1966	Ampholine专利
Shapiro等[57]	1967	SDS电泳
Hedrick等[58]	1968	Ferguson作图法(用于聚丙烯酰胺凝胶)
Clarke等[59]	1968	交叉免疫电泳
Weber和Osborn[60]	1969	SDS电泳技术的改进
Laemmli[61]	1970	不连续SDS电泳
Laurell等[62]	1972	火箭电泳
瑞典LKB公司[63]	1973	水平电泳槽Multiphor Ⅰ
Rilbe[64]	1973	等电聚焦分辨率公式
O'Farrell[65]	1975	ISO-DALT双向电泳
Klose[66]	1975	ISO-DALT双向电泳
Southern[67]	1975	Southern印迹法(DNA)
Gasparic等[68]	1975～1981	Immobiline合成专利
Rosengren等[69]	1976～1977	滴定曲线

续表

作　者	年　份	内　　容
Towbin H. 等[70]	1979	Western 印迹法(蛋白质)
Switzer R. C. [71]	1979	银染色
Merril C. R. 等[72]	1979	银染色
Oakley B. R. 等[73]	1980	银染色
Bjellgvist B. 等[74]	1982	固相 pH 梯度技术
Görg A. 等[75]	1985	IPG-DALT 双向电泳
Mocremans M. 等[76]	1985	金染色
瑞典 Pharmacia 公司[77]	1986	半干技术
Ünlü M 等[78]	1997	双向电泳中的荧光差异技术
Alban A 等[79]	2003	在荧光差异技术中引入内标

参考文献

[1] Bier M. Electrophoresis Theory, Methods And Application. New York. Academic Press, 1959 XV ~ XX
[2] Picton H, Linder S E. J. Chem. Soc., 1892 (61): 148
[3] Picton H, Linder S E. J. Chem. Soc., 1897 (71): 568
[4] Hardy W B. Physiol J. (London), 1899 (24): 288
[5] Hardy W B. Proc. Roy. Soc., 1900 (66): 110
[6] Hardy W B. Physiol J. (London), 1905 (33): 251
[7] Ellis R, Physik Z. Chem. (Leipzig), 1912 (80): 597
[8] Powis F. Physik Z. Chem. (Leipzig), 1915 (89): 186
[9] Reüss F F. Mem. Soc. Imperiale Naturalistes Moskau, 1809 (2): 327
[10] Porrett R. Ann. Philos., 1861 (74): 25
[11] Quincke G. Pogg. Ann., 1861 (113): 513
[12] Helmholtz H. Wied. Ann., 1879 (7): 337
[13] Smoluchowski M. Bull. Acad. Sci. Cracovie, 1903 (182): 66
[14] Michaelis L. Biochem. Z., 1909 (16): 81
[15] Abramson H A. Electrokinetic Phenomena. Reinhold. New York. 1934. 267
[16] Abramson H A, Michaelis L. J. Gen. Physiol., 1929 (12): 587
[17] Svedberg T, Jette E R. J. Am. Chem. Soc., 1923 (45): 954
[18] Scott N D, Svedberg T. J. Am. Chem. Soc., 1924 (46): 2700
[19] Svedberg T, Tiselius A. J. Am. Chem. Soc., 1926 (48): 2272
[20] Hjertén S. Free Zone Electrophoresis Almqvist, Uppsala, 1967, 34
[21] Tiselius A. Trans. Faraday Soc., 1937 (33): 524
[22] Philpot J S L. Nature, 1938 (141): 283
[23] Svensson H. Kolloid Z., 1939 (87): 181
[24] Longsworth L G. J. Am. Chem. Soc., 1939 (61): 529
[25] Longsworth L G. Chem. Rev., 1942 (30): 323
[26] Armstrong S H, Jr Budka M J E, Morrison K C. J. Am. Chem. Soc., 1947 (69): 416
[27] Ricketts W E, Sterling K. J. Clin. Invest., 1949 (28): 1477
[28] Marrack J R, Hoch H. J. Clin. Pathol., 1949 (2): 161

[29] Cooper G R, Craig H W, Beard J W. Am. J. Syph. Gonorrhea Vener. Dis., 1946 (30): 555
[30] Reiner M. Int. Rec. Med., 1957 (170): 374
[31] Longsworth L G. Ind. Eng. Chem. Anal. Ed., 1946 (18): 219
[32] Kegeles G, Gosting L J. J. Am. Chem. Soc., 1947 (69): 2516
[33] Labhart H, Staub H. Helv. Chim. Acta, 1947 (30): 1954
[34] Coulson C A, Cox J T, Ogston A G, Philpot J S L. Proc. R. Soc. London. A, 1949 (192): 382
[35] Moore D H, White J U. Rev. Sci. Instrum., 1948 (19): 700
[36] Lotmar W. Helv. Chim. Acta., 1949 (32): 1847
[37] Reiner M, Fenichel R L, Stern K G. Acta Haematol., 1950 (3): 202
[38] MAURER H R, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 1968. 349, 115
[39] Gaál ö, Medgyesi G A, Vereczkey L. Electrophoresis in the Separation of Biological Macro molecules. New York: John Wiley & Sons. Chichester. 1980.18
[40] Svensson H. In: Advances in Protein Chemistry: Anson, M. L. and Edsall, J. T. eds. (Acedemic Press, New York) Vol. Ⅳ, 1948: 251
[41] Grabar P, Williams C A Jr. Biochim. Biophys. Acta., 1953 (10): 193
[42] Kolin A. J. Chem. Phys., 1954 (22): 1628
[43] Kolin A. J. Chem. Phys., 1955 (23): 407
[44] Kolin A. Proc. Natl. Acad. Sci., USA., 1955 (41): 101
[45] Kolin A. In: Methods of Biochemical Analysis: Glick, D., ed (Wiley, Interscience, New York) Vol. 1958 (6): 259~288
[46] Raymond S, Weintraub L. Science, 1959 (130): 711
[47] Svensson. Ⅱ. Acta Chem. Scand, 1961 (15): 325~341
[48] Hjerten S. Arch. Biochem. Biophys. Suppl., 1962 (1): 147
[49] Hjerten S. J. Chromatog. 1963, (11): 66
[50] Fazekas de St. Groth, S Webster, R G, Datyner. A. Biochim. Biophys. Acta (Amst.), 1963 (71): 377
[51] Ornstein L. Ann. N. Y. Acad. Sci., 1964 (121): 321
[52] Davis B J. Ann. N. Y. Acad. Sci., 1964 (121): 404
[53] Righetti P G. Isoelectric Focusing: Theory, Methodology and Applications. Elsevier, Amsterdam. 1983. preface
[54] Ferguson K A. Metabolism, 1964 (13): 985
[55] Meyer T S, Lamberts B L. Biochiem. Biophys. Acta (Amst.) 1965 (107): 144
[56] Righetti P G. Isoelectric Focusing: Theory, Methodology and Applications. Elsevier, Amsterdam. 1983. 33
[57] Shapiro A L, Vinuela E, Maizel J V, Jr Biochem. Biophys. Res. Commun, 1967 (28): 815
[58] Hedrick J L, Smith A J. Arch. Biochem. Biophys., 1968 (126): 155
[59] Clarke M H G & Freeman T. Clin. Sci., 1968 (35): 403
[60] Weber K, Osborn M J. Biol. Chem., 1969 (244): 4406
[61] Laemmli U K. Nature, 1970 (227): 680
[62] Laurell C B, Scand J Clin. Lab. Invest. 29. Suppl., 1972 (124): 21~37
[63] LKB Catalogue. LKB Producter AB Sweden Stockholm, 1973
[64] Rilbe H, Ann N Y. Acad. Sci., 1973 (209): 11~22
[65] O'Farrell P. J. Biol. Chem., 1975 (250): 4007~4021

[66] Klose J. Humangenetik 1975 (26), 231～243
[67] Southern E. J. Mol. Biol., 1975 (98): 503～517
[68] Gasparic V, Bjellqvist B, Rosengren A. Swedish patent 140 49-1 (1975), US patent 4130470 (1978), French patent 7637402 (1980), British patent 1570698 (granted) and German patent 2656162 (1981)
[69] Rosengren A, Bjellqvist B, Gasparic V. In: Electrofocusing and Isotachophoresis; Radola, B. J. and Graesslin, D., eds. (de Gruyter, Berlin), 1977. 165～171
[70] Towbin H, Staehelin T, Gordon G. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1979 (76): 4350～4354
[71] Switzer R C, Merril C R, Shifrin S. Anal. Biochem, 1979 (98): 231
[72] Merril C R, Switzer R C, Van Keuren M L. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1979 (76): 4335～4339
[73] Oakley B R, Kirsch D R, Morris N R. Anal. Biochem., 1980 (105): 361
[74] Bjellqvist B, Ek K, Righetti P G, Gianazza E, Görg A, Westermeier R, Postel W. J. Biochem. Biophys. Methods 1982 (6): 317～339
[75] Görg A, Postel W, Günther S et al. Electrophoresis 1985 (6): 599～604
[76] Moeremans M, Daneels G et al. Anal Biochem., 1985 (145): 315～321
[77] "PhastSystem ™Owners Manual" Pharmacia AB. Uppsala, Sweden. 1986
[78] Ünlü M et al. Electrophoresis, 1997 (18): 2071～2077
[79] Alban A et al. Proteomics 2003 (3): 36～44

第2章 凝胶电泳的支持介质

电泳的早期形式，即在自由溶液中进行的移动界面电泳已成为历史，代之以采用支持介质（或称稳定介质）的区带电泳现在被广泛地使用。采用支持介质的目的是防止电泳过程中的对流和扩散，以使被分离的成分得到最大分辨率的分离。为此，支持介质应具备以下特性：化学惰性；不干扰大分子的电泳过程；化学稳定性好，均匀；重复性好；电内渗小等。

固体支持介质可以分为两类：一类是如纸、醋酸纤维素薄膜、硅胶、矾土、纤维素等。这些介质相对来说是化学惰性的，能将对流减到最小，使用这些支持介质进行蛋白质分离和在自由溶液中一样是基于 pH 环境中的蛋白质的电荷密度。但在有些情况下，它们也会与迁移颗粒发生相互作用而参与分离过程。另一类是淀粉、琼脂糖和聚丙烯酰胺凝胶。与上述相比，这些凝胶不仅能防止对流，把扩散减到最小，而且它们是多孔介质，孔径尺寸和生物大分子具有相似的数量级，因而具有分子筛效应。使用这些凝胶进行分离不仅取决于大分子的电荷密度，还取决于分子尺寸。如具有相同电荷密度和不同尺寸的两种蛋白质使用纸电泳不可能分离好，而使用梯度凝胶电泳来分离，由于分子筛效应，小分子会比大分子跑得快而使分辨率提高。为此第一类支持介质现在已被第二类支持介质所代替，而淀粉凝胶又由于其批号之间的质量相差甚大，很难得到重复的电泳结果，且胶层厚、分辨率低、电泳时间长、操作麻烦，实验室中已很少使用。琼脂糖凝胶孔径较大，对大部分蛋白质只有很小的筛效应。自从 1959 年 Raymond 和 Weintraub[1]首次使用聚丙烯酰胺凝胶作为电泳的支持介质，特别是 1964 年 Ornstein[2]和 Davis[3]发表他们有关的基础工作以来，聚丙烯酰胺凝胶已成为目前生化实验室最常用的支持介质。由于它的高分辨率，不仅能分离含有各种生物大分子物质的混合物，而且可以研究生物大分子的特性，诸如电荷、分子质量、等电点，甚至构象。可以说它是电泳过程中的“雷锋”，起了铺路石子的作用。

2.1 聚丙烯酰胺凝胶的形成和结构

聚丙烯酰胺凝胶（polyacrylamide gel ，PAG）是由丙烯酰胺（acrylamide）和交联试剂 N，N'-甲叉双丙烯酰胺（N，N'-methylenebisacrylamide）在有引发剂和增速剂的情况下聚合而成的。丙烯酰胺的单体形成长链，由 N，N'-甲叉双丙烯酰胺的双功能基团和链末端的自由功能基团反应而发生交联。聚丙烯酰胺凝胶的化学结构式和三维网状结构见图 2.1[4]和图 2.2[5]，两个单体的物理化学特

性见表 2.1。

$CH_2=CH$
$C=O$
NH_2

丙烯酰胺

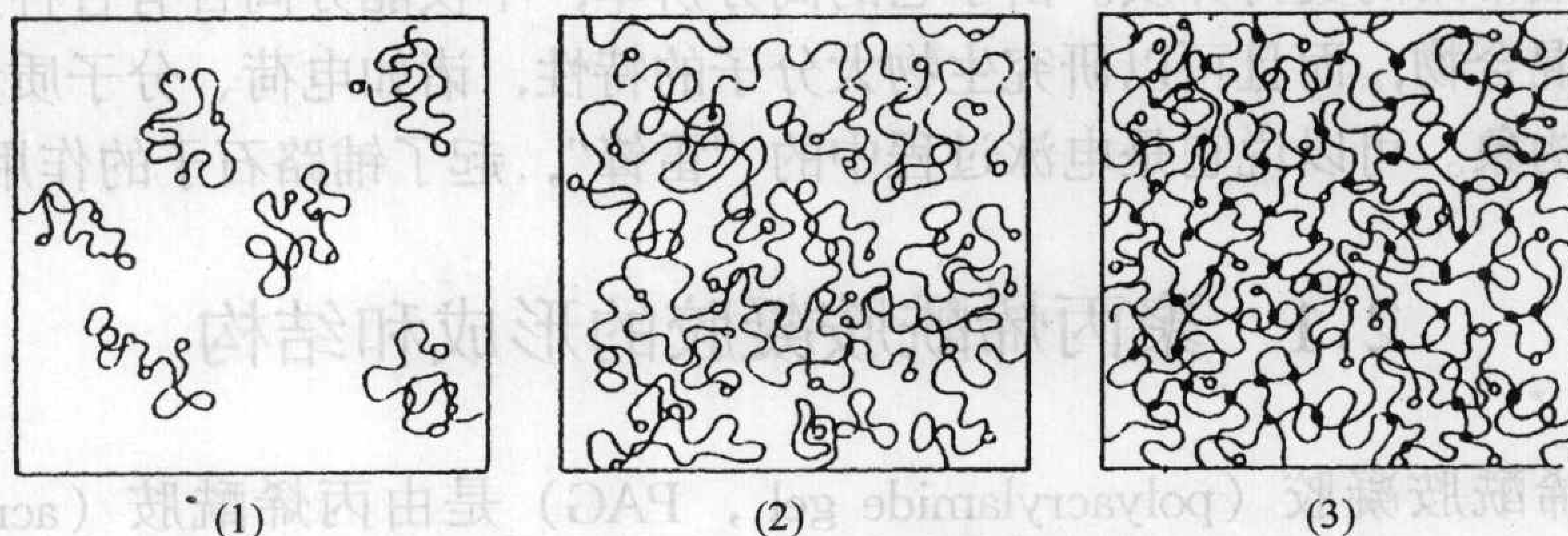
$CH_2=CH$
$C=O$
NH
CH_2
NH
$C=O$
$CH_2=CH$

N,*N′*-甲叉双丙烯酰胺

$-CH_2-CH-[CH_2-CH-]_n\ CH_2-CH-[CH_2-CH-]_n\ CH_2-$
$CO \quad CO \quad CO$
$NH_2 \quad NH \quad NH_2$
CH_2
NH
CO
$-CH_2-CH-[CH_2-CH-]_n\ CH_2-CH-[CH_2-CH-]_n\ CH_2-$
$CO \quad CO$
$NH \quad NH_2 \quad NH_2$
CH_2
NH
CO
$-CH_2-CH-[CH_2-CH-]_n\ CH_2-CH-[CH_2-CH-]_n\ CH_2-$
$CO \quad CO \quad CO$
$NH_2 \quad NH \quad NH_2$

聚丙烯酰胺

图 2.1　丙烯酰胺、*N*，*N′*-甲叉双丙烯酰胺和聚丙烯酰胺的化学结构式[4]



(1)　(2)　(3)

图 2.2　聚丙烯酰胺凝胶的三维网状结构[5]

—○—交联剂；—●—结点

(1) 稀溶液；(2) 浓溶液；(3) 凝胶

表 2.1　丙烯酰胺和 *N*, *N*′-甲叉双丙烯酰胺的物理化学特性

特　性	丙　烯　酰　胺	*N*, *N*′-甲叉双丙烯酰胺
分子式	CH_2═CH—CO—NH_2	(CH_2═CH—CO—NH)$_2$$CH_2$
分子质量(Da)	71.08	154.17
外　观	白色结晶粉末	白色结晶粉末
气　味	无	无
pH	>5(5%水溶液)	>5(2.5%水溶液)
可溶性(g.ml^{-1}, 30℃)	2.0(水) 1.1(甲醇) 0.4(丙酮) 0.4(氯仿)	0.31(水)
熔点或沸点(℃)	84.5±0.3	185(聚合时)
密度(D_4^{30})	1.122	—
保存要求	密封、避光	密封、避光
毒性	中枢神经毒物	中枢神经毒物

聚丙烯酰胺的特性，包括其机械性能、弹性、透明度、黏着度以及孔径大小均取决于两个重要的参数 T 和 C。T 是两个单体（丙烯酰胺和 *N*, *N*′-甲叉双丙烯酰胺）的总百分浓度。C 是与总浓度有关的交联百分浓度。Hjertén 教授[6]在 1962 年引入以下两个公式来计算，已为各实验室所常用：

$$T = \frac{a + b}{m} \cdot 100(\%)$$

$$C = \frac{b}{a + b} \cdot 100(\%)$$

这里 a 为丙烯酰胺的克数（g），b 为 *N*, *N*′-甲叉双丙烯酰胺的克数（g），m 为水或缓冲液的终体积（ml）。其中 a 与 b 的比例是很重要的[7]。如果 $a:b$ 小于 10，凝胶脆、硬，呈乳白色。如果 $a:b$ 大于 100，T 为 5%的凝胶呈糊状。富有弹性，且完全透明的凝胶，其重量比应在 30 左右，而且其中丙烯酰胺的浓度必须高于 3%。Davis[8]研究过 1.5%到 60%浓度范围的丙烯酰胺和 0%到 0.625%浓度范围的 *N*, *N*′-甲叉双丙烯酰胺。他发现在丙烯酰胺浓度低于 2%和 *N*, *N*′-甲叉双丙烯酰胺浓度低于 0.5%时，凝胶不可能聚合。他还注意到丙烯酰胺浓度的增加通常应该伴随 *N*, *N*′-甲叉双丙烯酰胺浓度的降低以得到富有弹性的凝胶。

Richards 等[9]在 1965 年提出一个便于选择 T 和 C 的经验公式：

$$C = 6.5 - 0.3T$$

这个公式能用于计算 T 为 5%～20%时的凝胶的组成。C 值并不很严格，在大多数情况下，可变化的范围约为 ±1%。

Brackenridge和Bachelard[10]以得到人血清白蛋白最佳分辨率为根据，用最小平方回归公式来计算凝胶最佳交联度时的N，N'-甲叉双丙烯酰胺百分浓度：

$$B = 0.201 - 0.0112T$$

这里B是N，N'-甲叉双丙烯酰胺的百分浓度，T是凝胶总百分浓度。

Blattler等[11]提出，N，N'-甲叉双丙烯酰胺在聚合过程中可能作为链的终止剂，并且在高浓度时可能减小其凝胶的孔径尺寸。2%～40%T的凝胶可以用以下公式来计算N，N'-甲叉双丙烯酰胺的用量：

$$N, N'\text{-甲叉双丙烯酰胺}(\text{mg}/100\text{ml}) = \frac{1300}{\text{丙烯酰胺}(\text{g}/100\text{ml})}$$

丙烯酰胺和N，N'-甲叉双丙烯酰胺溶液在自然光、γ射线、超声波的引发下会发生聚合，故应存放在棕色瓶中避光保存。虽然这两种单体在固体状态时相对比较稳定，它们可在室温下至少保存一年，但它们在溶液状态时是不稳定的，30%的丙烯酰胺只能在4℃保存一个月[12]。丙烯酰胺在贮存期间（在酸、碱条件下）会水解成丙烯酸而增加电泳时的电内渗现象和减慢电泳迁移率。

2.2 丙烯酰胺和N，N'-甲叉双丙烯酰胺的纯化和毒性

丙烯酰胺和N，N'-甲叉双丙烯酰胺作为聚丙烯酰胺凝酸的主要成分应该有相当的纯度，否则将影响凝胶的聚合，大分子的迁移和等电聚焦电泳的pH梯度。丙烯酰胺中的主要不纯物质是丙烯酸、直链聚丙烯酸胺和离子污染物。丙烯酰胺的纯化有不同方法。Loening[13]方法是将70g丙烯酰胺在50℃溶解在1L氯仿中，热过滤（不要抽滤）。将溶液冷却到-20℃，结晶，在冷漏斗中过滤，再用氯仿或庚烷洗结晶，干燥备用。Stegink等[14]的方法是将3kg的丙烯酰胺溶解在2L水中，温和加热使其充分溶解后冷却到室温，用布氏漏斗过滤，再冷却到4℃，收集结晶。剩下的溶液用活性炭在60℃处理1小时（每升1g），过滤，便可作丙烯酰胺贮液，其浓度可以根据折射指数（RI）用以下公式计算：

$$(W/V)\% = \frac{(RI - 1.334)}{1.46 \times 10^{-3}}$$

Allen[15]方法是将90g丙烯酰胺溶解在300ml醋酸乙酯和300ml的苯中，加热至70℃，热过滤，冷却到20℃。结晶用真空过滤，干燥，直到没有苯的气味。再将结晶溶解在540ml氯仿中，加热至60℃，热过滤。再冷却到不低于22℃。结晶被保存在氯仿中，需用时真空抽滤，干燥。Shepherd等[16]是从1体积丙酮和3体积的苯的混合溶液中过滤丙烯酰胺结晶的。结晶丙烯酰胺水溶液的pH是4.9～5.2。

丙烯酸不能完全从上述纯化结晶的方法中除去。它的存在将影响凝胶的聚合和降低一些蛋白的迁移率[17]。可以用离子交换层析去除它[18]。

N，N'-甲叉双丙烯酰胺的重结晶也可以用 Loening[13] 的方法。在 40～50℃以每升 10g 的浓度将它溶解在丙酮中，热过滤，将溶液慢慢冷却到 -20℃，用冷丙酮洗结晶，真空干燥备用。

丙烯酰胺和 N，N'-甲叉双丙烯酰胺纯度测定的方法[18] 是将 1.0～1.5g 样品溶解在蒸馏水中，终体积 500ml。在 250ml 带有双盖、分离漏斗和有抽真空的玻璃连接器的碘瓶（iodine flask）中加样品溶液和 0.1mol/L $KBrO_3$-KBr（2.79g $KBrO_3$ + 10g KBr/L）。在约 12mmHg（1.60Pa）的真空度下滴加 3mol/L H_2SO_4，避光，高频振荡 20 分钟。加 15ml 20％ KI 溶液，停止抽真空后，立即用淀粉作指示剂滴定，并用以下公式计算：

$$\% = \frac{(x - y)z}{\text{样品重量(g)}}$$

这里 x 和 y 分别为空白和实验用的 0.05mol/L $Na_2S_2O_3$ 的毫升数。用于丙烯酰胺测定时，z 为 3.554。用于 N，N'-甲叉双丙烯酰胺测定时，z 为 3.854。

丙烯酰胺和甲叉双丙烯酰胺是一种对中枢神经系统有毒的试剂[20,21]，即使是 1％的稀溶液与皮肤接触也会引起皮肤发炎。小鼠确切致死量（LD_{50}）为 170mg/kg，所以在实验操作时应尽可能避免直接接触和吸入粉尘。在不具备安全操作条件的实验室中，不要进行丙烯酰胺和 N，N'-甲叉双丙烯酸胺的纯化。

2.3 引发剂、增速剂和聚合

丙烯酰胺的聚合通常是由化学或光化学过程完成的，常用过硫酸铵、过硫酸钾或核黄素来引发这个过程，用 N，N，N'，N'-四甲基乙二胺、3-二甲胺丙腈等作为聚合过程中的增速剂。这种引发-增速的催化系统是氧化-还原过程，因为它会产生自由基用于丙烯酰胺凝胶的聚合。现在常用的系统见表 2.2。在系统中即使有小量的第四脂肪胺，如 N，N，N'，N'-四甲基乙二胺的存在，便可催化由过硫酸铵产生的自由基的形成，从而加速聚合。3-二甲胺丙腈的作用似乎弱一点[8]。过硫酸铵的优点是容易得到高纯度的试剂。在 0℃时相对稳定且释放分子氧的可能性很小。合适的催化系统必须不改变凝胶的缓冲条件、黏度和导电性。

表2.2 常用的丙烯酰胺聚合的催化系统[22,23]

引发剂	增 速 剂
过硫酸铵	N,N,N',N'-四甲基乙二胺 (N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine, TEMED)
过硫酸铵	3-二甲胺丙腈 (3-dimethylaminopropionitrile, DMAPN)
过硫酸铵	3-二甲胺丙腈亚硫酸盐
过氧化氢	硫酸铁-抗坏血酸
核黄素	N,N,N',N'-四甲基乙二胺(光催化过程用)

丙烯酰胺的化学聚合是由过硫酸铵（或过硫酸钾、过氧化氢等）在碱性条件下产生游离氧自由基引发单体丙烯酰胺成为自由基状态而成的。其聚合过程与一些因素有关[24]。

(1) 引发剂和增速剂的浓度　用紫外吸收测量发现聚合的初速率和过硫酸铵浓度的平方根成正比[25]。作者[26]亦观察到*N*，*N*，*N′*，*N′*-四甲基乙二胺浓度的增加可使凝胶的聚合时间大大缩短。虽然增加过硫酸铵和*N*，*N*，*N′*，*N′*-四甲基乙二胺的浓度可以增加聚合速率，但是过量的过硫酸铵和*N*，*N*，*N′*，*N′*-四甲基乙二胺会引起电泳时的烧胶和蛋白电泳带的畸变。为了得到理想的电泳结果，应该使用合适的配方使聚合过程约在30～60分钟内完成[27]。

(2) 系统的pH　在酸性pH，由于缺少*N*，*N*，*N′*，*N′*-四甲基乙二胺（或3-二甲胺丙腈）的游离碱，引发过程会被延迟。Watkin等[25]观察到在pH8.8时，7.5%的丙烯酰胺溶液在最初几分钟内聚合很慢，接着反应速率迅速增加，聚合基本完成，半小时后速率很快下降。但同样浓度的溶液在pH4.3时，聚合初速率较慢，聚合大约需90分钟才能完成。

作者[27]在制作酸性范围（pH2.5～4.5）的等电聚焦凝胶时也观察到过硫酸铵-*N*，*N*，*N′*，*N′*-四甲基乙二胺系统并不能促使丙烯酰胺的聚合。用添加$AgNO_3$，$Fe_2(SO_4)_3$或KNO_3作为增速剂的结果提示$AgNO_3$是可被选用的。

碱性范围的凝胶虽然容易聚合，但硬且脆，在染色、脱色过程中易破裂，故应尽可能减少过硫酸铵和*N*，*N*，*N′*，*N′*-四甲基乙二胺的量。

(3) 温度的影响　在聚合过程中温度对凝胶的特性有很大的影响[24]。在低温（5℃）时不易聚合，且凝胶会变脆和混浊，重复性也不好。在25～35℃时聚合，凝胶会比较透明而有弹性。但高浓度凝胶在聚合时会产生热使气体溶解，导致在凝胶中产生小气泡。此时适当降低温度，可以将这种影响降到最小。

(4) 分子氧　分子氧的存在会阻碍凝胶的化学聚合[7,24]因此对不含SDS的凝胶，特别是等电聚焦用的凝胶，最好先抽气，再加引发剂。

(5) 凝胶系统中的不纯物　金属或其他杂质的存在也会影响凝胶的化学聚合[7]，所以选用高纯的丙烯酰胺和甲叉双丙烯酰胺是非常重要的。它们的特性和纯化方法已在上节中介绍。

常用作引发剂的过硫酸铵为白色粉末或结晶，分子质量为288.2Da。固体粉末可在室温保存，但它在溶液状态十分不稳定，需在4℃保存，最好新鲜配制，且选用金属杂质含量尽可能少的商品[12]。作为凝胶聚合的引发剂可用过硫酸钾代替，它在4℃时可溶性很低，所以可用4℃时的饱和溶液方便地代替不稳定的过硫酸铵。凝胶中的过硫酸盐可用Bennick[29]的方法来检测。如果过硫酸盐的浓度高于8～14μg/ml，在一些缓冲液中会出现蓝色。

常用作增速剂的四甲基乙二胺是一种易吸湿的无色液体，分子质量为116.21Da。有浓烈的氨味。熔点或沸点为120～122℃，密度为0.777(D_4^{20})，折

射率（*RI*）为1.418(n_4^{20})。它易被氧化，形成黄色产物。吸水则加速氧化。黄色的氧化产物会降低增速作用，最好不要使用。商品四甲基乙二胺的纯度至少应为99%，不需纯化，可用气相色谱方法分析。暂时不用的四甲基乙二胺最好密封保存在深冻冰箱中[12]。

与化学聚合相反，用核黄素进行光聚合时需要少量的氧[30]。核黄素在光照下分解，黄素被还原成无色型；在有少量氧的条件下，无色型的黄素又被氧化成有游离基的黄素环使聚合开始。光聚合的优点一是用量少，不会对被分析的样品有任何不良的影响。二是聚合所需时间可以较自由地控制。缺点是光照量不易掌握。

一些溶液添加剂[30]，如Tris、四甲基乙二胺、盐酸和甘氨酸。四甲基乙二胺是一种温和的还原试剂（氢给体），它可以通过给体-受体反应与核黄素和丙烯酰胺单体形成复合物，从而加速聚合。

Rabilloud等使用光聚合方法进行酸性凝胶的聚合可以得到较好的效果[31~36]。这是采用100μmol/L亚甲基蓝（methylene blue，MB）作为引发剂，1 mmol/L甲苯亚磺酸钠（sodium tolune sulfinate，STS）为还原剂，50μmol/L二苯氯化碘（diphenyliodonium choride，DPIC）为氧化剂进行光聚合。

2.4 聚丙烯酰胺凝胶的有效孔径和分子筛效应

在使用液体介质的电泳中，带电颗粒的分离主要取决于它们的净电荷。但是凝胶不同于液体介质，它具有高黏度和高的摩擦阻力。它作为支持介质不仅能防止对流，并能把扩散减到最小，而且能影响大分子颗粒的迁移过程。在凝胶中大分子的分离取决于它的电荷，尺寸和形状。凝胶的这种用于分离不同尺寸分子的特性是由于它的尺寸筛分能力（size sieving capacity），所以这种现象被称为分子筛效应（molecular sieving effect）。

聚丙烯酰胺凝胶的有效孔径取决于它的总浓度 *T*，有效孔径随着 *T* 的增加而减小。当凝胶浓度小于2.5%时，可以筛分分子质量为10^6以上的大分子，但此时的凝胶几乎是液体。通常需要加0.5%的琼脂糖来增加凝胶的硬度。相反，如果总浓度 *T* 大于30%，则可以筛分分子质量小于2kDa的多肽[37]，但实际上这样高浓度的凝胶既硬又脆，是无法使用的。Ornstein[38]计算了7.5%的聚丙烯酰胺凝胶的平均孔径为50 Å，而30%凝胶的平均孔径为20 Å左右。所以

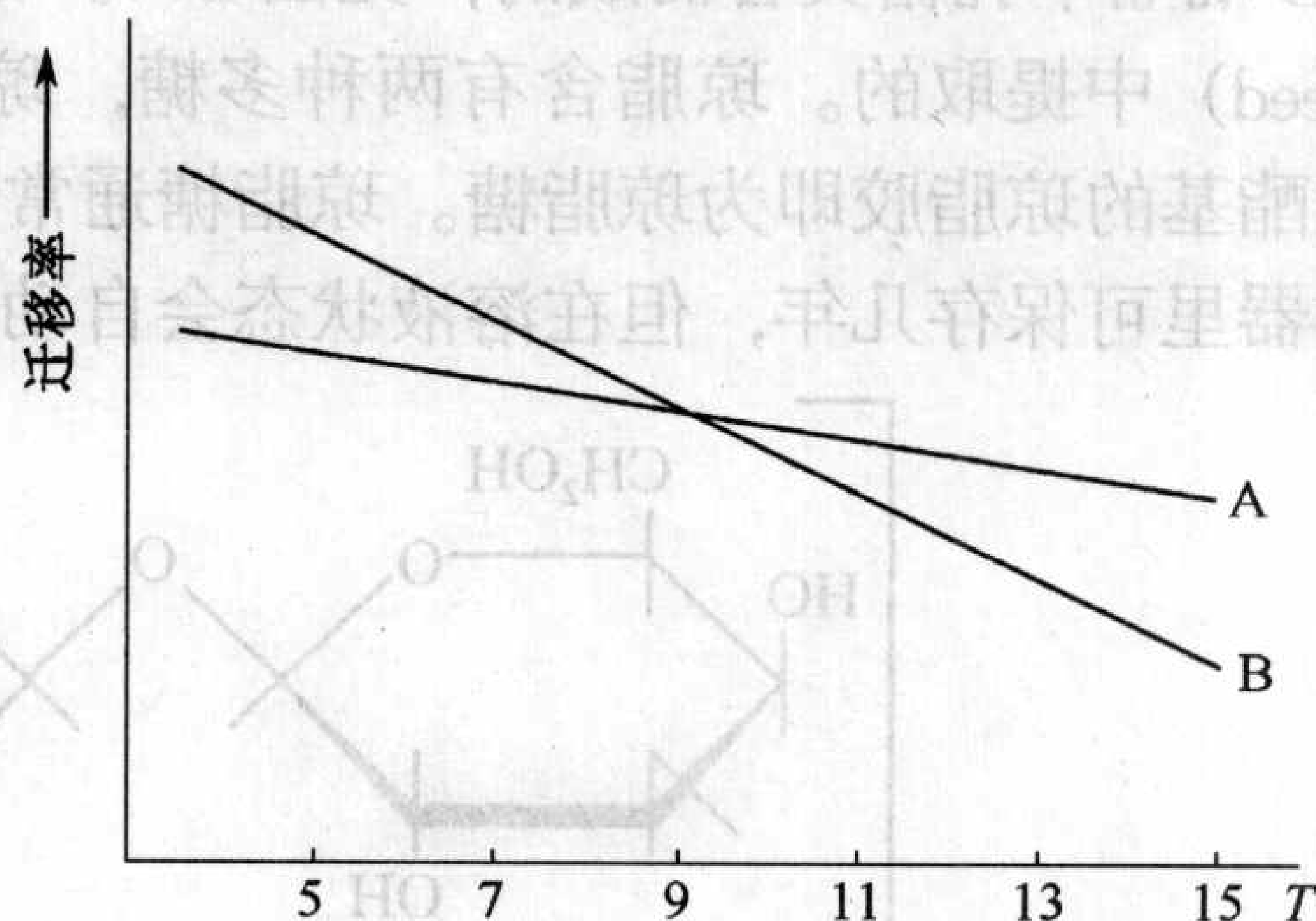


图2.3　凝胶浓度 *T* 对样品迁移率的影响[38]

聚丙烯酰胺凝胶总浓度的选择对蛋白质混合物的分离效果是十分重要的。如图2.3所示，在混合物中有两个蛋白质组分A和B，其中A的分子质量小于B，而B带电荷多。如果T为5%时，B走在A的前面，两组分能被很好地分离。如果T增加，分子筛效应也增加，B的迁移速度减慢。当T为9%时，由于A和B迁移率相同，就无法分离了。在高浓度时，凝胶孔径小，但A组分的分子质量比B组分小，A有比较高的迁移率。所以要分离好一个混合物，并不是任何凝胶条件都可以被满足的，而必须考虑一个相对完整的方案。而且即使得到一条单一的带，也不能证明只有单一的均一成分。为了证明均一性，还应该用具有不同分子筛效应的不同孔径的凝胶电泳和改变分子电荷的不同pH的实验。

聚丙烯酰胺凝胶的有效孔径除了与其总浓度T有关外，还与其交联度C有关。如果在聚合过程中没有交联剂，只能形成无序的多聚体链，不能聚合成凝胶，只能形成黏状液。只有在聚合过程中有N，N'-甲叉双丙烯酰胺存在时，无序的多聚体链才能交联而形成共价筛网。有效孔径则随着交联剂的增加而减小。

一般来说，当C保持恒定时，有效孔径随着T的增加而减小，当T保持恒定，C为4%时，有效孔径最小；C大于或小于4%时，有效孔径均变大；C大于5%时，凝胶变脆，且相对比较疏水，不宜使用[37]。但Fawcett等[39]报道，不管T是多少，N，N'-甲叉双丙烯酰胺的浓度为5%时，有效孔径最小。Campbell等[40]则报道，当T为15%时，达到最小孔径所需要的交联剂的比例随着T的增加而增加。Righetti等[41]报道，T为5%，N，N'-甲叉双丙烯酰胺浓度也为5%时，孔径约为20nm。

2.5 琼脂糖凝胶的性能、结构与特点

琼脂糖是从琼脂中精制分离出来的胶状多糖（gel-forming polysaccharide）。它的分子结构大部分是由1，3连接的β-D吡喃半乳糖和1，4连接的3，6脱水α-D吡喃半乳糖交替而成的，见图2.4。琼脂是从天然的红色的墨角藻（red-seaweed）中提取的。琼脂含有两种多糖，琼脂糖和琼脂胶。脱去硫酸酯基和丙酮酸酯基的琼脂胶即为琼脂糖。琼脂糖通常是白色粉末，有时稍稍带色，它在密封容器里可保存几年，但在溶液状态会自动裂解。

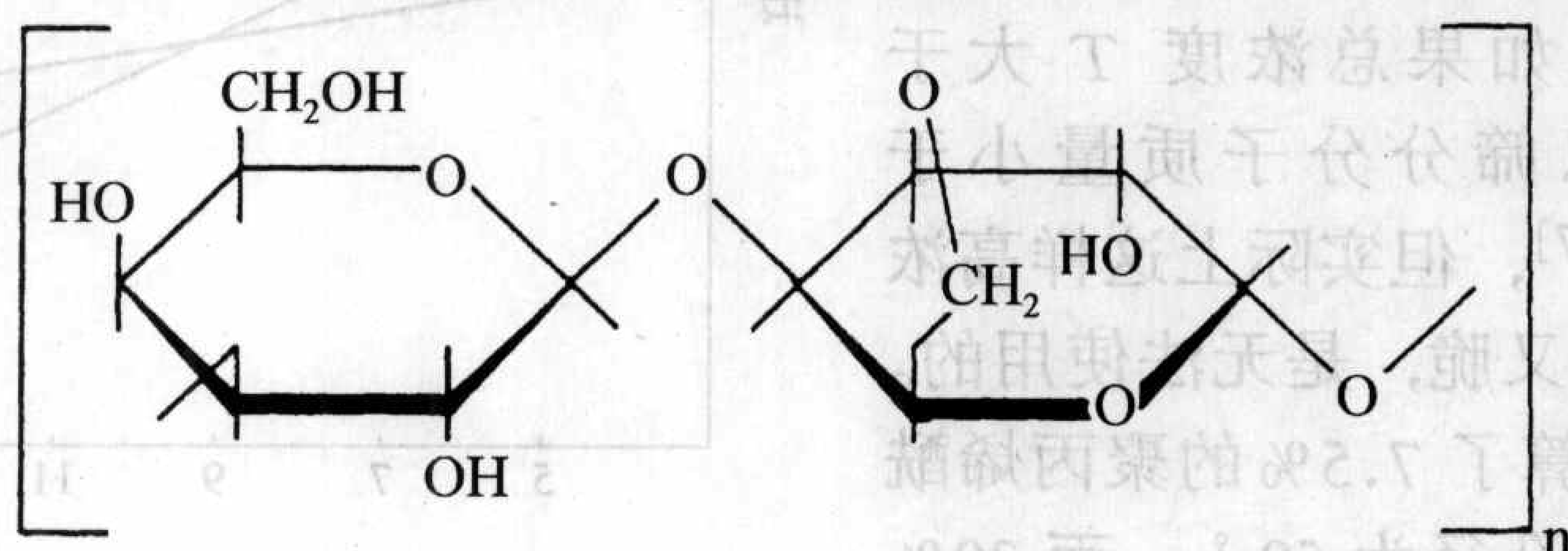


图2.4 琼脂糖的结构式[42]

琼脂糖凝胶作为生命科学和相关领域研究中的重要介质材料是由于它的特殊物理化学特性。它作为电泳基质有如下的优点：

1）琼脂糖凝胶是具有大量微孔的基质，其孔径尺寸取决于它的浓度。0.075%琼脂糖的孔径为800nm，0.16%的孔径为500nm，1%琼脂糖的孔径为150nm，这是通常使用的浓度。它可以分析大到百万道尔顿分子质量的大分子[42]。但电泳分辨率低于聚丙烯酰胺凝胶。这种大孔径特性有利于免疫固定、免疫电泳和微量制备。

2）琼脂糖具有较高的机械强度，允许在1%或更低的浓度下使用。且在这种浓度下仍然有筛分和抗对流的特性。但一般来说，它的机械强度低于聚丙烯酰胺凝胶，常在水平电泳系统中使用。且在蛋白电泳中，常将琼脂糖凝固在玻璃板或塑料膜上。

3）琼脂糖无毒，不像常作为凝胶介质的丙烯酰胺和*N*，*N′*-甲叉双丙烯酰胺是中枢神经系统毒物而给操作者带来不便。琼脂糖胶凝过程中不会发生自由基聚合，无需催化剂。

4）染色、脱色程序简单、快速，背景色较低。

5）琼脂糖凝胶有热可逆性、低胶凝温度及低熔点的琼脂糖可以容易地回收样品，如那些对温度敏感的生物大分子，常用于制备电泳。

6）生物中性，与别的生物只有很小的结合。

7）琼脂糖凝胶很容易干成薄膜，而不龟裂，适于光密度扫描和永久保存。

8）琼脂糖凝胶是高灵敏度放射自显影的理想材料。

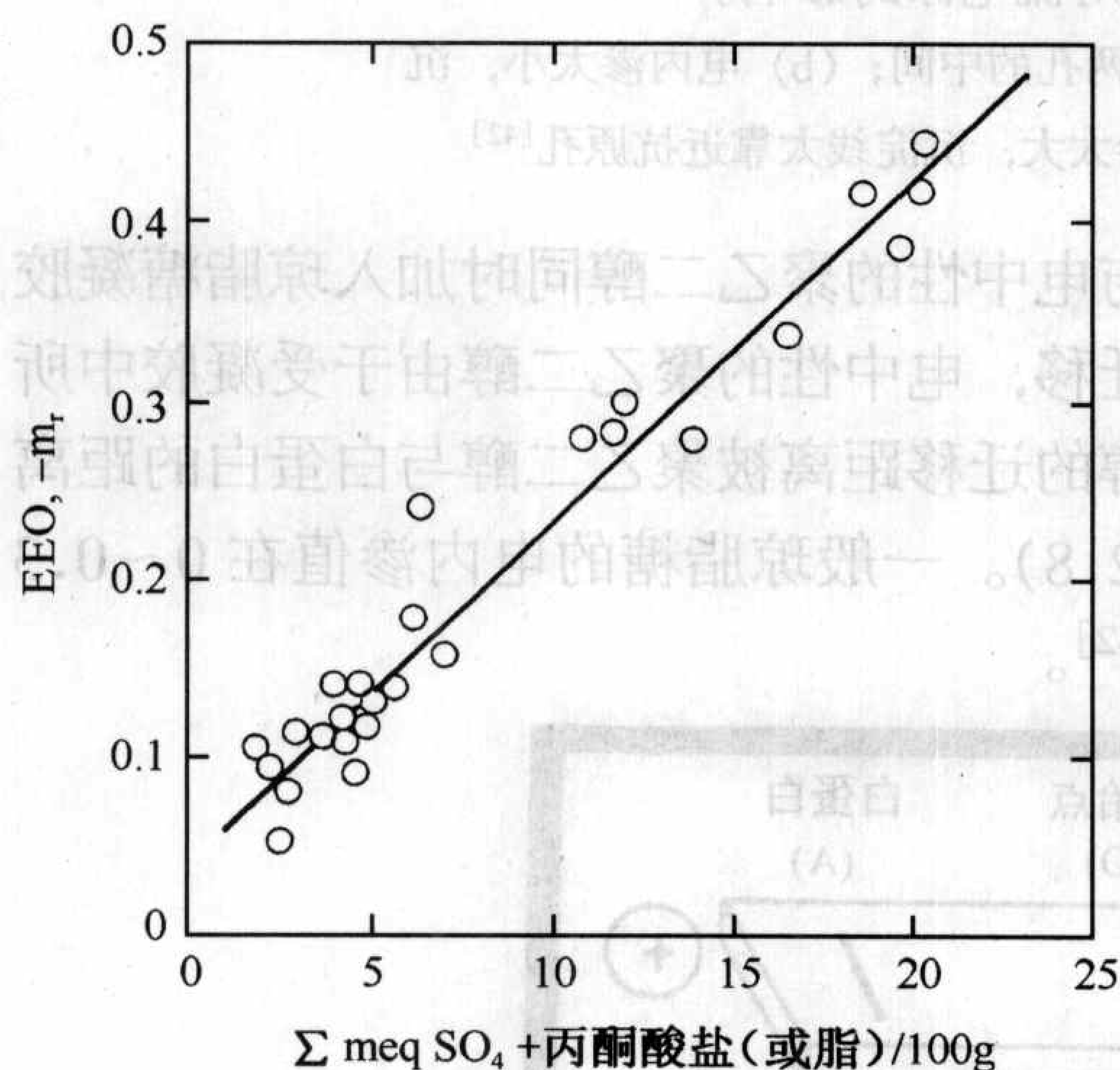


图2.5　琼脂糖的电内渗与琼脂糖中的总的阴离子残基的关系[42]

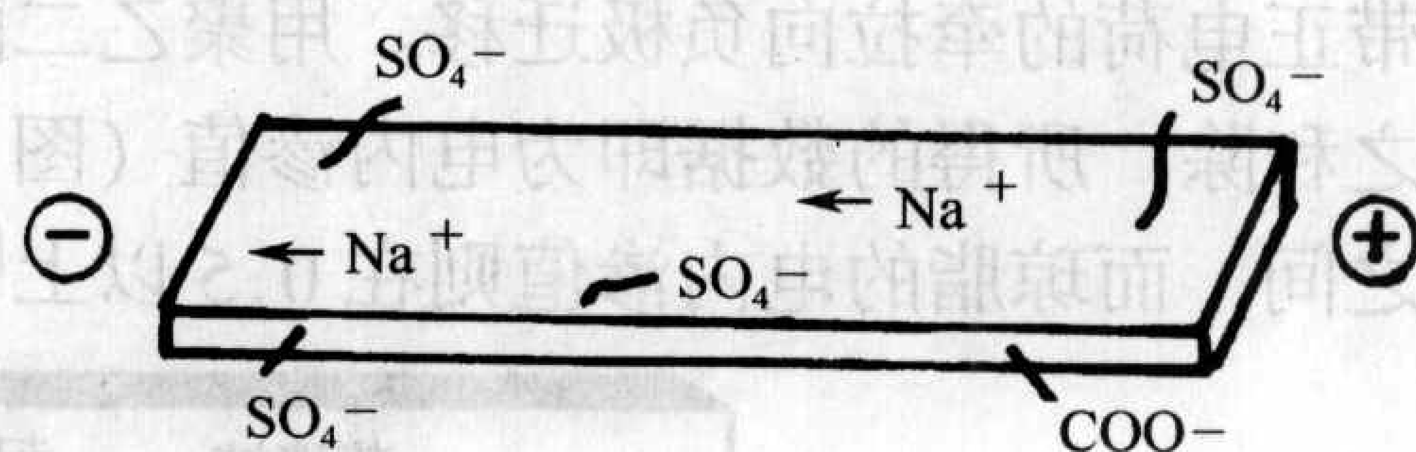


图2.6　电内渗：阴离子基团被固定在介质中，相应的阳离子与它的结合水一起向阴极迁移[42]

琼脂糖的主要性能指标如下：

（1）电内渗（electroendosmosis） 简称 EEO[43,44]，是琼脂糖电泳过程中的一种重要现象。它是由琼脂糖多糖骨架上的带电基团，主要是硫酸酯和丙酮酸盐引起的，见图 2.5 和图 2.6。与凝胶中的这些阴离子基团相结合的是向阴极迁移的水合抗衡离子（hydrated counter ions），水也因此而被这些离子推向阴极。在电场中不能迁移的样品中的中性分子或接近中性的分子也在液体中被拽向阴极。

对于一些电泳，如对流电泳，电内渗是有益的，因为它将增加阳离子蛋白的分辨率。电内渗对对流免疫的影响见图 2.7。高、中电内渗的琼脂糖常用作各种免疫电泳的支持介质。高电渗的琼脂糖对免疫球蛋白 IgG 和 IgM 的分离效果最好。电内渗的高低对 DNA 的分离没有显著地影响，但使用高电内渗琼脂糖分离 DNA 所需的电泳时间要比低电内渗稍长，因为电内渗对大分子的迁移有一定的阻碍作用。大分子（如 IgM）的等电聚焦电泳必须使用零电内渗琼脂糖。如凝胶介质有电内渗，会使 pH 梯度向阴极漂移[24]。

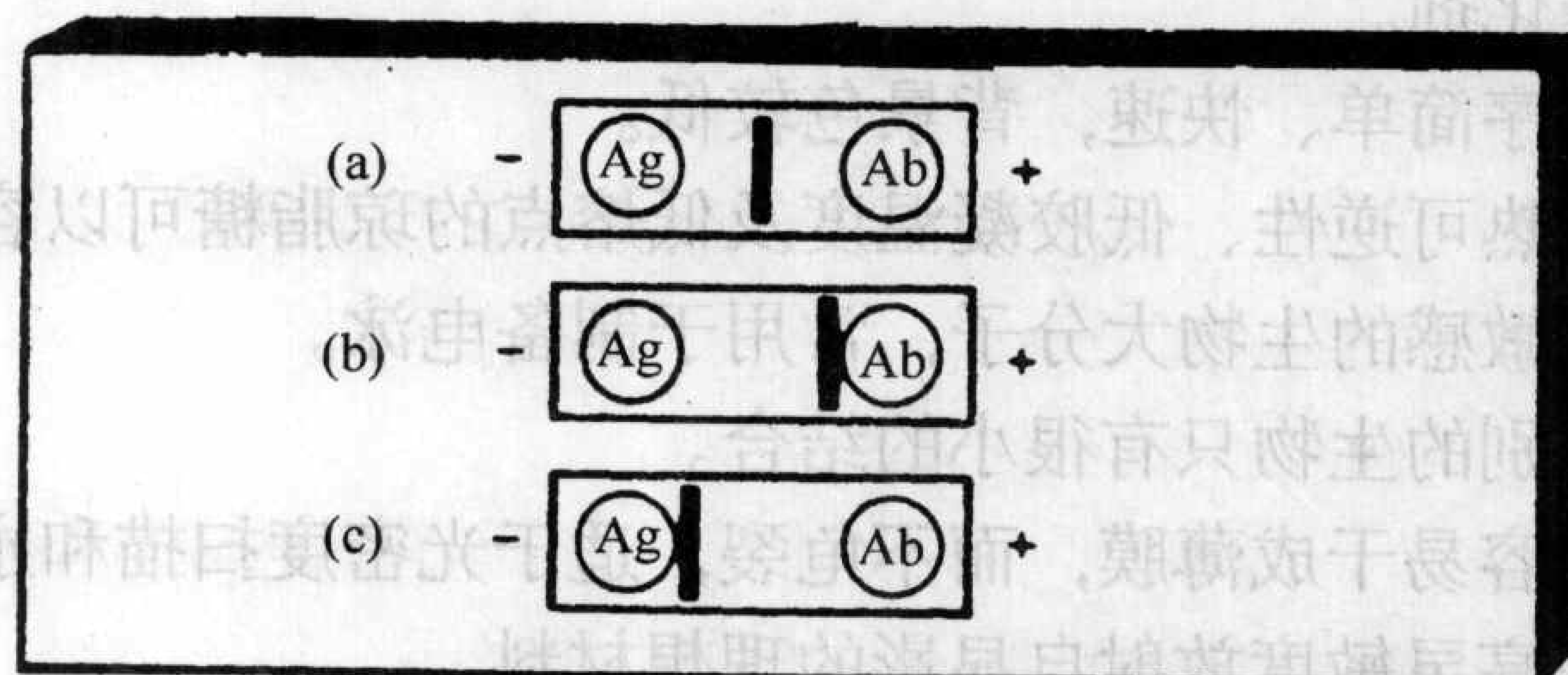


图 2.7　电内渗对对流电泳的影响。

（a）合适的电内渗，免疫沉淀线在两孔的中间；（b）电内渗太小，沉淀线太靠近抗体孔；（c）电内渗太大，沉淀线太靠近抗原孔[42]

电内渗的测定是用带负电的白蛋白与电中性的聚乙二醇同时加入琼脂糖凝胶板的原点孔内，通电后，白蛋白向正极迁移，电中性的聚乙二醇由于受凝胶中所带正电荷的牵拉向负极迁移。用聚乙二醇的迁移距离被聚乙二醇与白蛋白的距离之和除，所得的数据即为电内渗值（图 2.8）。一般琼脂糖的电内渗值在 0～0.3 之间，而琼脂的电内渗值则在 0.5 以上[42]。

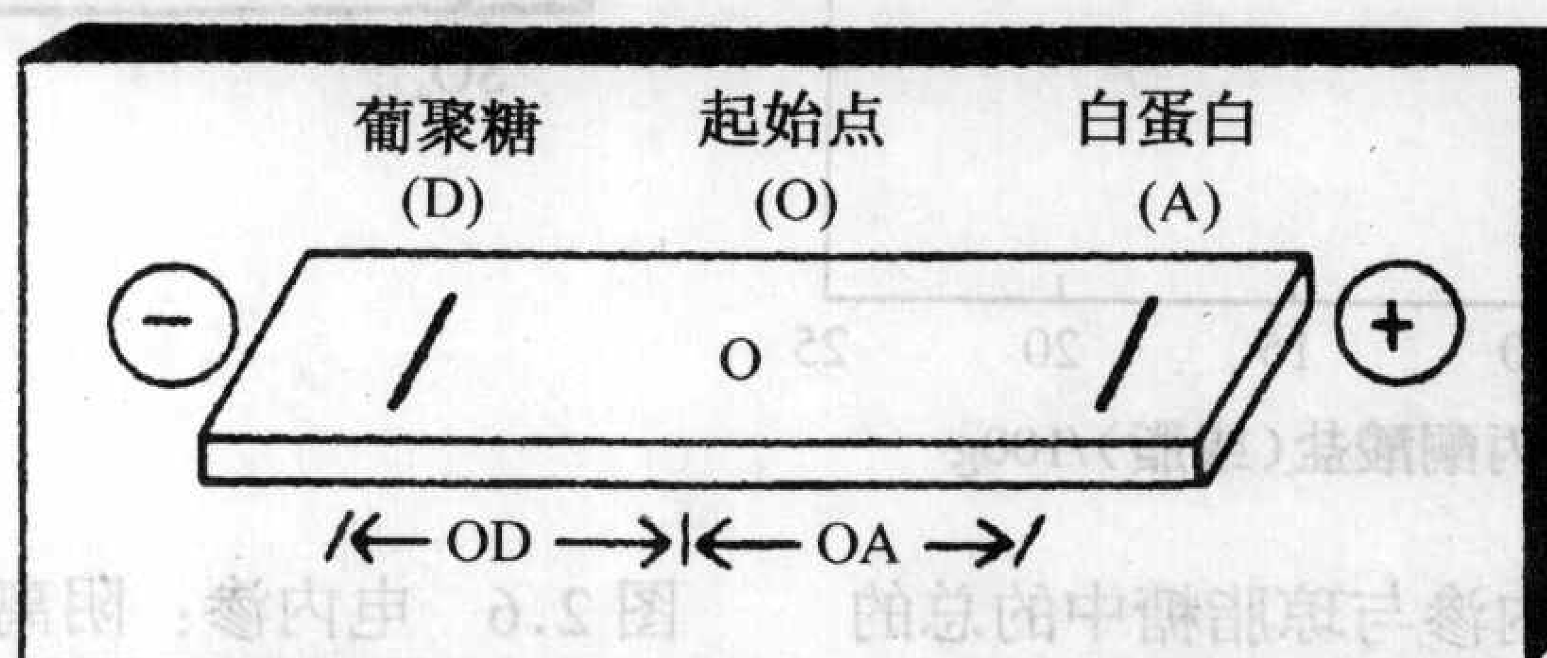


图 2.8　电内渗的测定[42]

(2) 胶凝温度　将琼脂糖溶液加热至 90℃以上溶解，然后将温度下降到某一温度时由液态转变为不流动的固态，此温度即凝固点，称胶凝温度。一般为 35～43℃。但用于制备的琼脂糖，胶凝温度需低于 30℃。Guiseley[45]曾报道甲基化作用对琼脂糖胶凝温度的影响。天然甲基化程度越高，胶凝温度也越高。相反，合成甲基化作用的程度越高，胶凝温度却越低（图 2.9）。不同取代基，如羟乙基、烯丙基、乙酰基等对琼脂糖胶凝温度的影响见图 2.10。

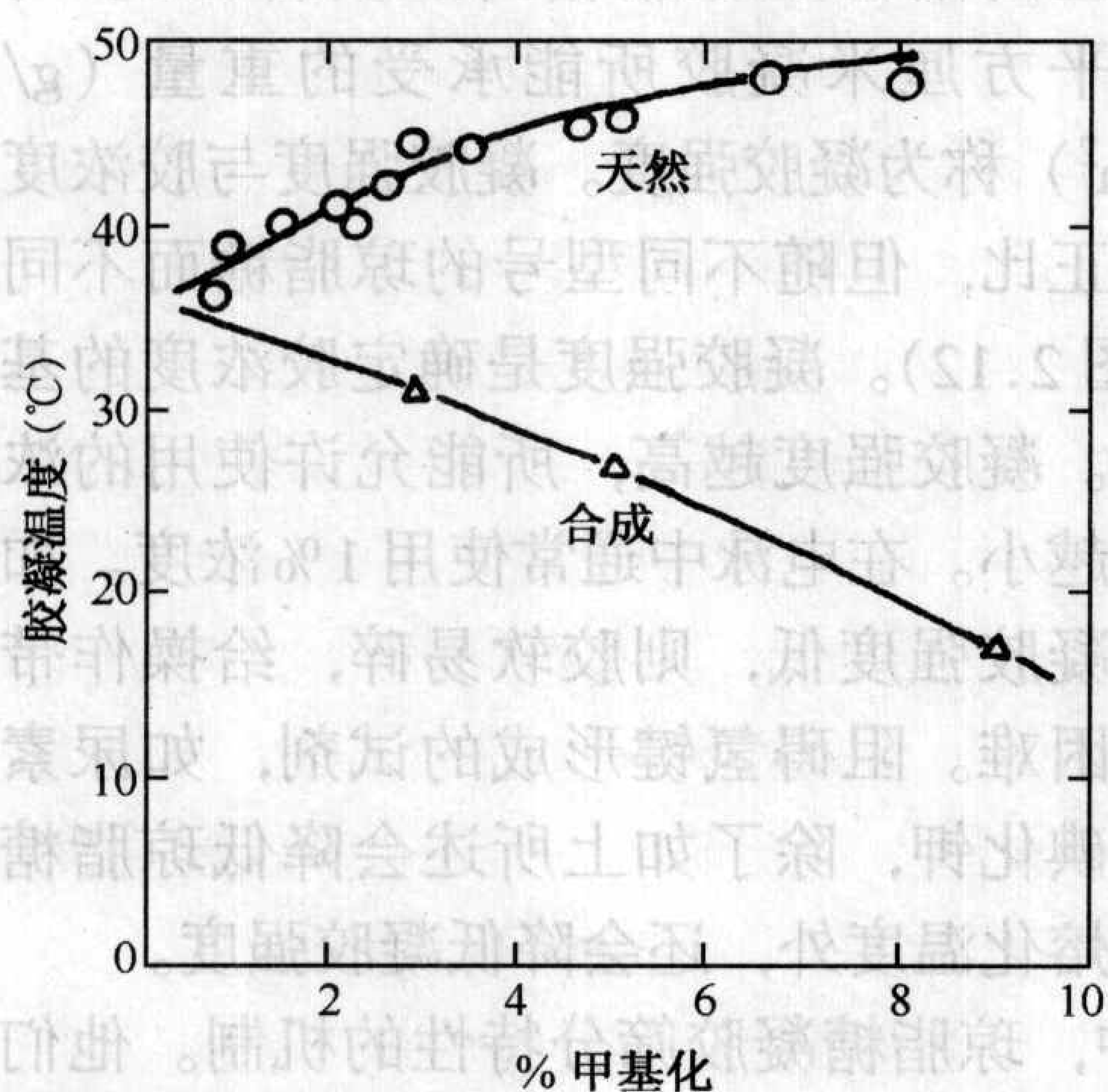


图 2.9　天然和合成甲基化作用对胶凝温度的影响[42]

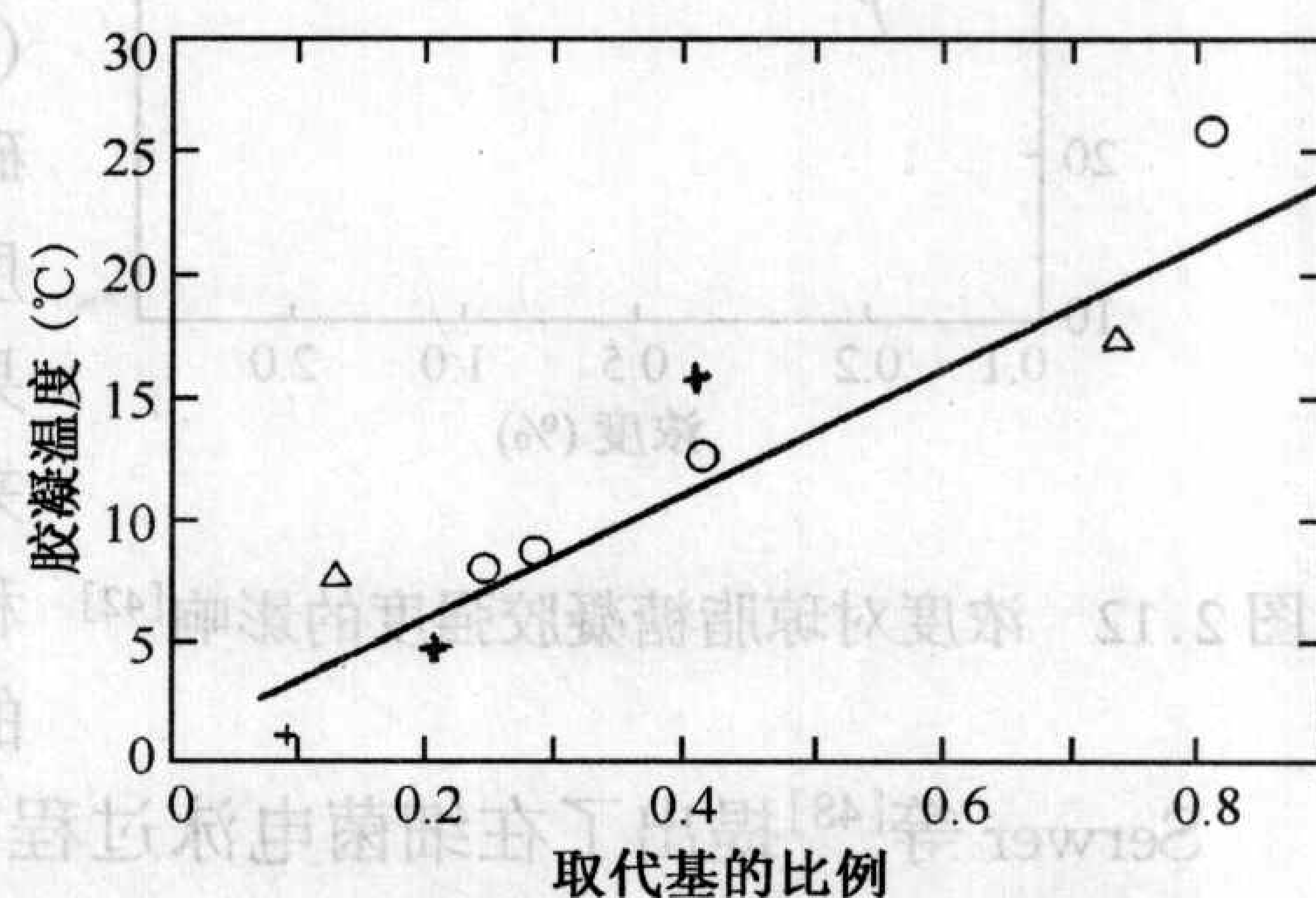


图 2.10　不同取代基对琼脂糖胶凝温度的影响[42]

○羟乙基；△烯丙基；＋乙酰基

琼脂糖胶凝作用的机制首先由 Rees[46]提出，以后由 Arnott 等[47]证实。琼脂糖在溶液中分子呈自由卷曲状态。在胶凝的最初阶段变为双螺旋，然后变成双螺旋束而凝固成胶。

(3) 熔化温度　这是指加热凝固后的凝胶由固态转变为液态时的温度即熔化点，称熔化温度。一般在 75～90℃。但用于制备目的的低熔点琼脂糖其熔化温度需低于 30℃。以便重新熔化琼脂糖回收样品时，不破坏分子的结构。一般来说胶凝温度与熔化温度的差距越大越好。不同浓度的琼脂糖对胶凝温度和熔化温度的影响不大，见图 2.11。

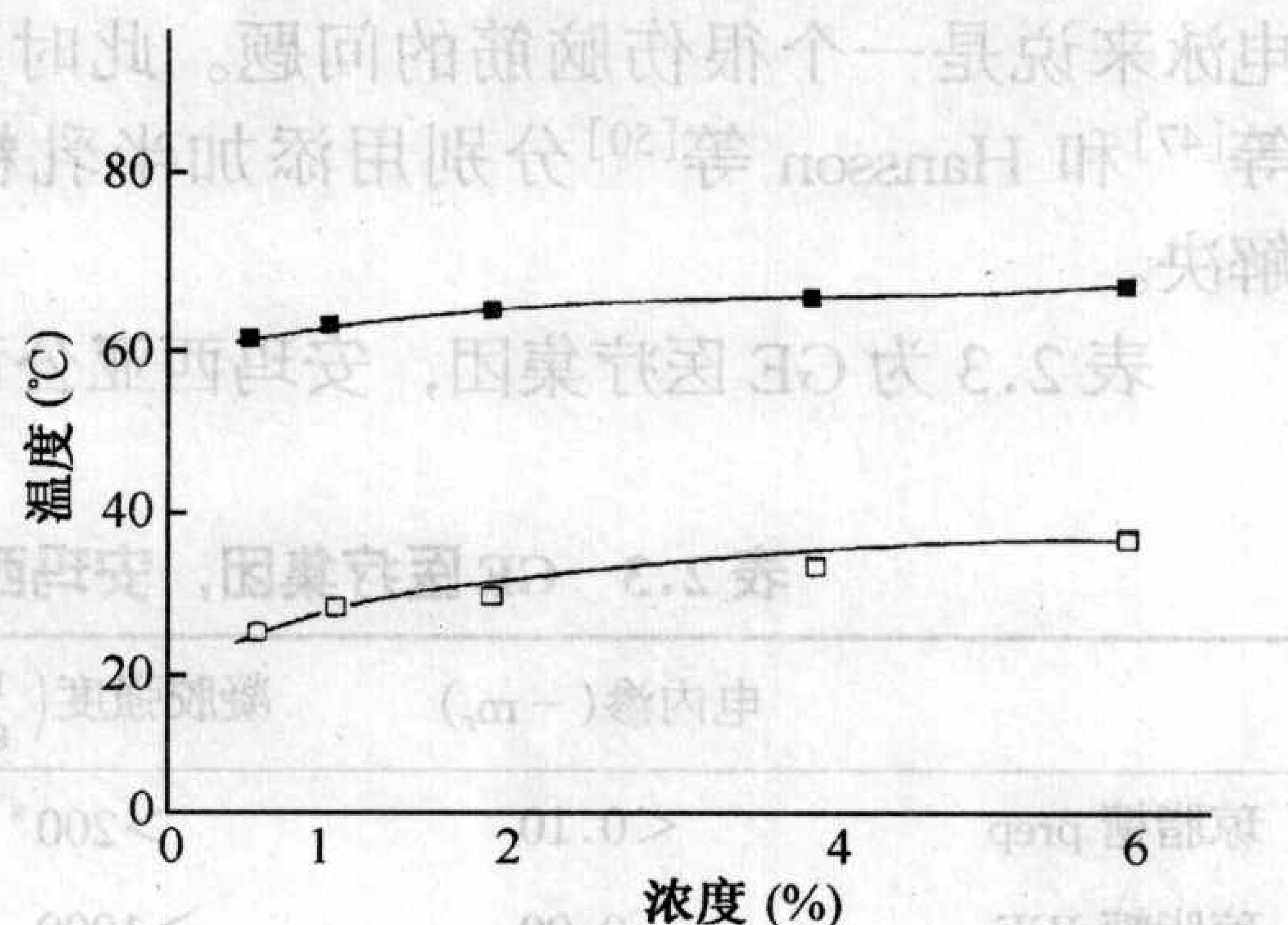


图 2.11　不同浓度的琼脂糖对胶凝温度和熔化温度的影响[42]

□胶凝温度；■熔化温度

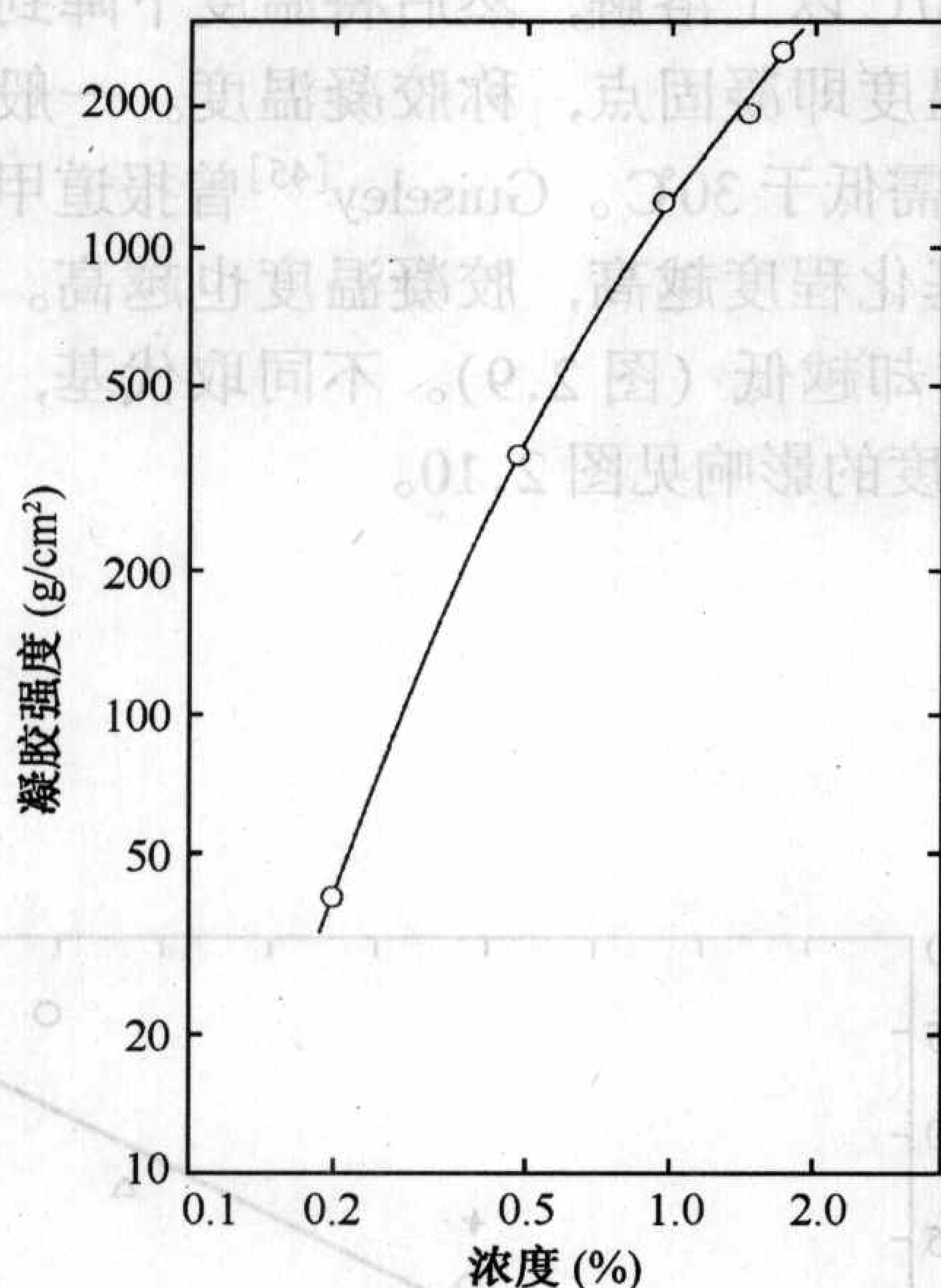


图 2.12　浓度对琼脂糖凝胶强度的影响[42]

一些阻碍氢键形成的试剂，如尿素和碘化钾，会降低琼脂糖凝胶的熔化温度，甚至阻止氢键的形成而影响胶凝，所以在添加尿素的等电聚焦凝胶电泳时必须注意。

(4) 凝胶强度　由凝胶中分子排布产生的刚性是琼脂糖的重要特性之一。每平方厘米凝胶所能承受的重量（g/cm^2）称为凝胶强度。凝胶强度与胶浓度成正比，但随不同型号的琼脂糖而不同（图 2.12）。凝胶强度是确定胶浓度的基础。凝胶强度越高，所能允许使用的浓度越小。在电泳中通常使用 1%浓度。如果凝胶强度低，则胶软易碎，给操作带来困难。阻碍氢键形成的试剂，如尿素和碘化钾，除了如上所述会降低琼脂糖的熔化温度外，还会降低凝胶强度。

Serwer 等[48]提出了在细菌电泳过程中，琼脂糖凝胶筛分特性的机制。他们认为这是在不改变纤维束直径时松开双螺旋的捆（packing）。这也说明了琼脂糖凝胶的透明性质。琼脂糖的羟乙基化作用也使凝胶透明。

(5) 脱水收缩作用（syneresis）　这是指从琼脂糖凝胶中挤压出液体的现象。在胶凝时由于小量的内部挤压引起收缩而造成在凝胶表面出水，对等电聚焦电泳来说是一个很伤脑筋的问题。此时要将凝胶表面的水用滤纸吸干。Cook 等[47]和 Hansson 等[50]分别用添加半乳糖，甘露聚糖和用电荷平衡琼脂糖来解决。

表 2.3 为 GE 医疗集团，安玛西亚公司各种性能的琼脂糖[51]。

表 2.3　GE 医疗集团，安玛西亚公司琼脂糖的性能 * [51]

	电内渗（$-m_r$）	凝胶强度（$\frac{1.5\%}{g/cm^2}$）	胶凝温度(℃)	熔化温度(℃)
琼脂糖 prep	<0.10	>200 **	<30	65
琼脂糖 IEF	0.00	>1000	40～43	—
琼脂糖 NA	0.10	2400	34～37	—

* 2005 年目录。

** 1%琼脂糖。

2.6 电泳新介质

聚丙烯酰胺凝胶和琼脂糖凝胶是目前电泳最常用的两种支持介质，但由于它们的一些局限性，这些年来人们正在寻求新材料以适合电泳分离的需要。Chiari 和 Righetti[52~54]采用新型分离材料，包括丙烯酰胺单体的一些替代物和聚乙二醇来配制新型大孔径凝胶，如一些 *N*-取代聚丙烯酰胺材料 poly-*N*-acryloyl-Tris（NAT）gels、*N*-Acryloyl sugars、Acryloylmorpholine、Hydrolink^{TM} gels 和 *N*-acryloylaminoethoxye thanol（AAEE）等。AAEE 和 acrylamido-*N*，*N′*-diethoxyethanol 具有以下的优点[55]：①具有极强的水解稳定性，即使在 0.1mol/L NaOH 中，70℃时也十分稳定。在酸性环境中也同样十分稳定，适合作为酸碱性 pH 范围等电聚焦的支持介质；②具有高度亲水性；③孔径大，适合大分子质量物质的分离。一些 *N*-取代的丙烯酰胺单体的化学结构和交联剂的化学结构见图 2.13 和图 2.14[54]。

试剂名	结构式	分子质量 /kDa
N,*N*-Dimethyl acrylamide (DMA)		99
N-Acryloy-2-amino-2-hydroxy methyl-1,3-propane (Trisacryl)		175
N-Acryloyl morpholine		141
N-Acryloyl-1-amino-1-deoxy D-glucitol		235

图2.13　一些 *N*-取代的丙烯酰胺单体的化学结构[54]

试剂名	结构式	分子质量/kDa	链长
N,N'-Methylene bisacrylamide (Bis)		154	9
Ethylene diacrylate (EDA)		170	10
N,N'-(1,2-Dihydroxy ehtylene) bisacrylamide (DHEBA)		200	10
N,N'-Diallyltartardiamide (DATD)		228	12
N,N',N''-Triallyl citric triamide (TACT)		309	12-13
Polyethylene glycol diacrylate 200 ($PEGDA_{200}$)		214	13
N,N'-Bisacrylyl cystamine (BAC)		260	14
Polyethylene glycol diacrylate 400 ($PEGDA_{400}$)		400	25

图2.14 一些交联剂的化学结构[54]

作为大分子电泳分离的支持介质，琼脂糖-聚丙烯酰胺混合凝胶是很有前途的。琼脂糖的 allylglycidyl 衍生物见图2.15[54]。它既具有聚丙烯酰胺分辨率高的优点，又具有琼脂糖孔径大、机械强度大，可以分离大分子的优点。这种介质可以分离25MDa[56]的大分子，可用于病毒[57]、SDS变性分子和高分子质量的脂蛋白的分析[58,59]。

Harrington等[60]将一些海绵状的材料作为电泳的支持介质，称为“电泳海绵”。它与聚丙烯酰胺和琼脂糖相比，机械强度大，结构稳定，可以直接测量孔径。电泳海绵有大量的通道，可以同时进行多方向分离，并且可以加大量的样品，他们还可以切割成任何形状，便于操作，也便于保存。电泳海绵可以是疏水的或亲水的，孔径尺寸在1nm～100μm之间。载体两性电解质可以在电泳海绵

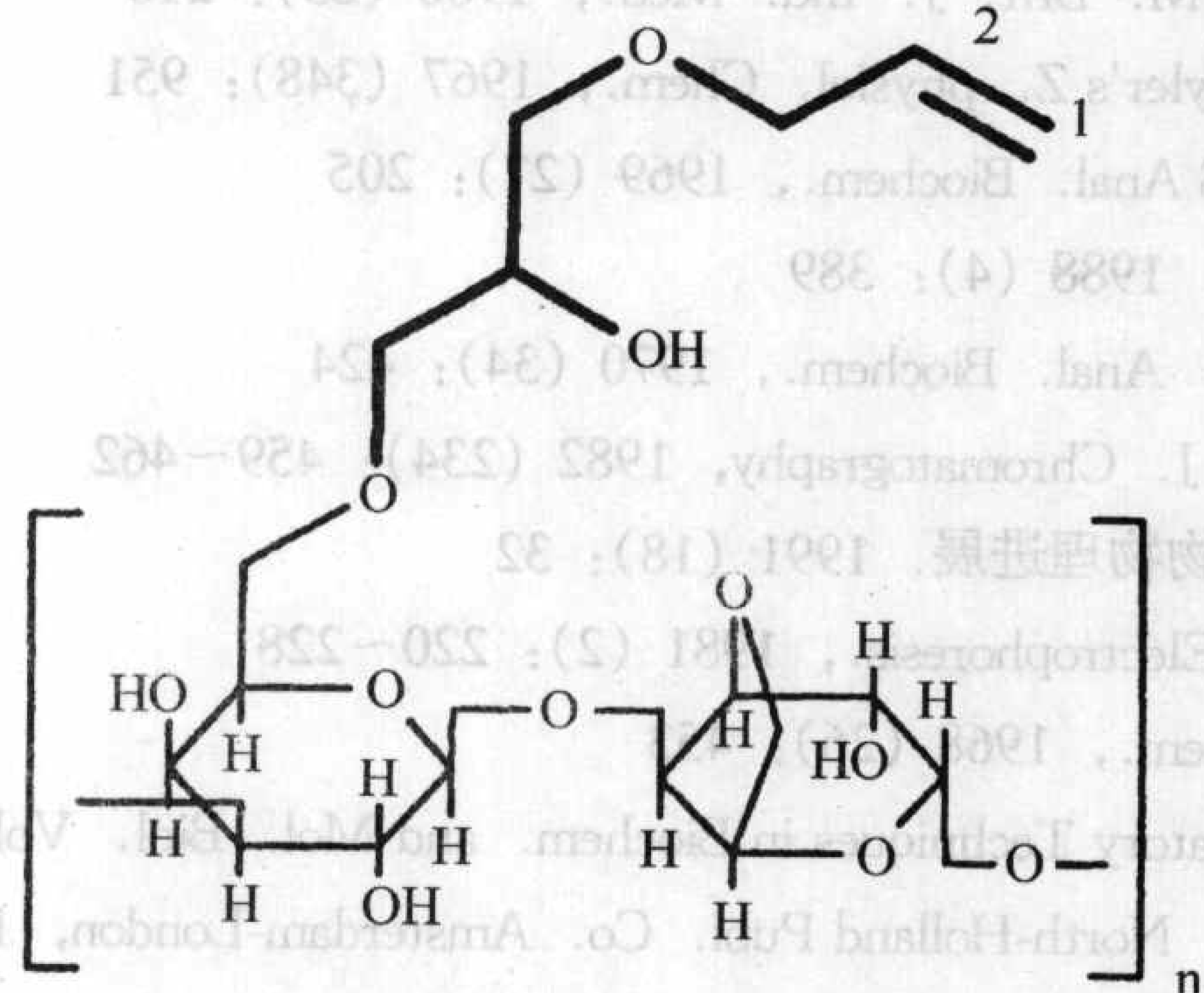


图2.15 allylglycidyl 衍生的琼脂糖的化学结构[54]

中建立比在聚丙烯酰胺凝胶中更为线性的宽或窄的 pH 梯度。等电聚焦的速度比在聚丙烯酰胺凝胶中快，分辨率也更好，虽然这种材料还处于试验阶段，但它可能是一种潜在的电泳支持介质。

参考文献

[1] Raymond S, Weintraub L. Science, 1959 (130): 711

[2] Ornstein L. Ann. N. Y. Acad. Sci., 1964 (121): 321

[3] Davis B J. Ann. N. Y. Acad. Sci., 1964 (121): 404

[4] Hames B D, Rickwood. Gel Electrophoresis of Protein: The Pratical Approach Series. IRL Press, Oxford. 1990.4

[5] Vollmert B. Grundlagen der makromolekularen Chemic. Berlin: Springer. 1962 388

[6] Hjertén S. Arch. Biochem. Biophys. Suppl., 1962 (1): 147

[7] Ott H. Prot. Biol. Fluids, 1963 (10): 305

[8] Davis B J. Annals N. Y. Acad. Sci., 1964 (121): 404

[9] Richards E G, Coll J A, Gratzer W B. Anal. Biochem., 1965 (12): 452

[10] Brackenridge G J, Bachelard H S. J. Chromatog., 1969 (41): 242

[11] Blattler D P. Bradley A R. Anal. Biochem., 1972 (47): 296

[12] Righetti P G. Immobilized pH gradients: theory and methodology. Elsevier. Amsterdam. 1990.124

[13] Loening U E. J. Biochem., 1967 (102): 251

[14] Stegink L D, Meyer P D, Chalkley R. Anal. Biochem., 1971 (41): 351

[15] Allen R C. Ortec 4200 Electrophoresis System. Instr. Manual, 1969

[16] Shepherd G R, Gurley L R. Anal. Biochem., 1966 (14): 356

[17] Raymond S, Nakamichi M. Anal. Biochem., 1962 (3): 23

[18] Maurer H R. Disc Electrophoresis and Related Techniques of Polyacrylamide Gel Electrophoresis, Walter de Gruyter, Berlin-New York. 1971.34

[19] Maurer H R. “Disc Electrophoresis and Related Techniques of Polyacrylamide Gel Electrophoresis”, Walter de Gruyter, Berlin-New York. 33

[20] Allen R C, Popp R A, Moore D J. J. Histochem. Cytochem., 1965 (13): 249

[21] Fullerton P M, Barnes J M. Brit. J. Ind. Med., 1966 (23): 210
[22] Stegemann H. Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem., 1967 (348): 951
[23] Jordan E M, Raymond S Anal. Biochem., 1969 (27): 205
[24] 郭尧君. 生物物理学报. 1988 (4): 389
[25] Watkin J E, Miller R A. Anal. Biochem., 1970 (34): 424
[26] Guo Yaojun, Bishop R. J. Chromatography, 1982 (234): 459~462
[27] 郭尧君. 生物化学与生物物理进展. 1991 (18): 32
[28] Gelfi C, Righetti P G. Electrophoresis., 1981 (2): 220~228
[29] Bennick A. Anal. Biochem., 1968 (26): 453
[30] Gordon A H. in: Laboratory Techniques in Biochem. and Mol. Biol. Vol. 1, part Ⅰ, Work. T. S., and Work, E., editors, North-Holland Publ. Co. Amsterdam-London, 1969. 1~145
[31] Lyubimova T, Caglio S. Gelfic etal Electrophoresis, 1993 (14): 40
[32] Lyubimova T, Righetti P G. Electrophoresis, 1993 (14): 191
[33] Righetti P G, Bossi A, Giglio M etal. Electrophoresis, 1994 (15): 1005
[34] Rabilloud T, Vincon M, Garin J. Electrophoresis, 1995 (16): 1414
[35] Rabilloud T, Girardot V, Lawrence J J. Electrophoresis, 1996 (17): 67
[36] Rabilloud T. Electrophoresis, 1996 (17): 813
[37] Hames B D, Rickwood D. Gel electrophoresis. of Protein: A Practical Approach. Second Edition. IRL Press. Oxford. 1990: 5
[38] Ornstein L. Annals N. Y. Acad. Sci., 1964 (121): 321
[39] Fawcett J S, Morris C J O R. Separation Studies. 1966 (1): 9
[40] Campbell W P, Wrigley C W, Margolis. J. Anal. Biochem., 1983 (129): 31
[41] Righetti P G, Brost B C W, Snyder R S. J. Biochem. Biophys. Methods, 1981 (4): 347
[42] Agarose Monograph. Fourth Edition. FMC Ltd. Rockland USA. 1988. 51~56
[43] Mimenz P C. Principles of Colloid and Surface Chemistry, Marcel Decker, New. York, 1977
[44] Adamson A W. Physical Chemistry of Surfaces, John Wiley & Sons, New. York 1976
[45] Guiseley K B. Carbohydr. Res., 1970 (13): 247~256
[46] Rees D A. J. Biochem., 1972 (126): 257~273
[47] Arnott S, Fulmer A, Scott W E, Dea l C M. J. Mol. Biol., 1974 (90): 269~284
[48] Serwer P, Allen J L, Hayes S J. Electrophoresis, 1983 (4): 232~236
[49] Cook R B, Witt H J. "Agarose Composition, Aqueous Gel And Method of Making Same", U. S. Patent 1981 (4): 290~911
[50] Hansson H A, Kagedal S L. Medium for lsoelectric Focusing, U. S. Patent 1982 (4): 312~739
[51] Amersham Bio-sciences catalogue. Uppsala, Sweden. 2004. 402
[52] Charlionet R, Levasseur L, Malandain J. J. Electrophoresis, 1996 (17): 58~66
[53] Righetti P G. Electrophoresis, 1992 (13): 587~595
[54] Chiari M, Righetti P G. Electrophoresis, 1995 (16): 1815~1829
[55] Chiari M, Micheletti C, Nesi M. Electrophoresis, 1994 (15): 177~186
[56] McDevitt C A, Muir H. Anal. Biochem., 1971 (44): 612~622
[57] Wolf G, Casper R. J. Gen. Virol., 1971 (12): 325~329
[58] Marcel Y J, Theolis R et al. J. Biol. Chem., 1982 (257): 13165~13168
[59] Moulin S, Fruchart J C, Dewaily P et al. Clin. Chim. Acta., 1979 (91): 159~163
[60] Harrington M G, Lee K H, Baily J et al. Electrophoresis, 1994 (15): 187~194

第3章　凝胶电泳仪器的进展

电泳系统虽然只是作为生化分离分析所必需的常规仪器，但它的进展与其他大型仪器设备一样，同样是非常迅速的。如第一章中所述，从1809年俄国物理化学家Reŭss的第一次电泳实验所用的雏形装置到1946年瑞典物理化学家，诺贝尔奖获得者Tiselius教授的第一台商品自由移界电泳系统问世经历了一个多世纪。但此后的50多年电泳仪器的发展却极其迅猛，特别是电泳介质由流动相改为凝胶后，各种各样的凝胶电泳装置便层出不穷以适应各种研究工作和生产实践的需要。

凝胶电泳仪作为生化实验室常用的小型仪器，种类很多。随着技术的不断发展，电泳仪器的分析对象也越来越专一化。按分析对象可分为蛋白质分析用、核酸分析用和细胞分析用；按功能可分为制备型、分析型、转移型、浓缩型等。按形式分，除了早期的自由移动界面电泳使用U型玻璃管以及在90年代中期盛行的毛细管电泳外，凝胶电泳按装置的形状可分为圆盘（管状）电泳，垂直平板和水平平板电泳。从垂直管型盘状电泳发展到垂直板状电泳，再发展到半自动和全自动水平平板电泳仪，其分辨率越来越高，操作越来越简单，电泳时间越来越短，功能越来越多。

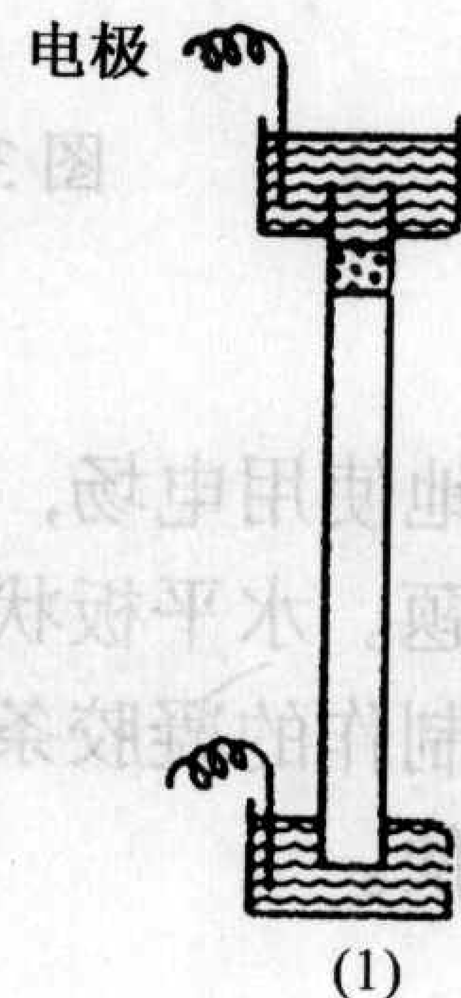




图3.1　缓冲液和凝胶直接接触[1]

(1) 管状凝胶电泳

(2) 垂直板状电泳

凝胶电泳系统一般由电泳槽，电源和冷却装置组成。同时配套的有各种灌胶模具，染色用具等。此外还有电泳转移仪、凝胶干燥器和凝胶扫描仪。

3.1 电　泳　槽

电泳槽是凝胶电泳系统的核心部分，其系统的迅猛发展主要也是体现在电泳槽上。根据电泳的原理，凝胶都是放在两个缓冲腔之间，电场通过凝胶连接两个缓冲腔。缓冲液和凝胶之间的接触可以是直接的液体接触，见图3.1，也可以间接通过滤纸桥、凝胶条或滤纸条，见图3.2。管状凝胶电泳和垂直板状电泳大多采取直接液体接触方式。这种方式

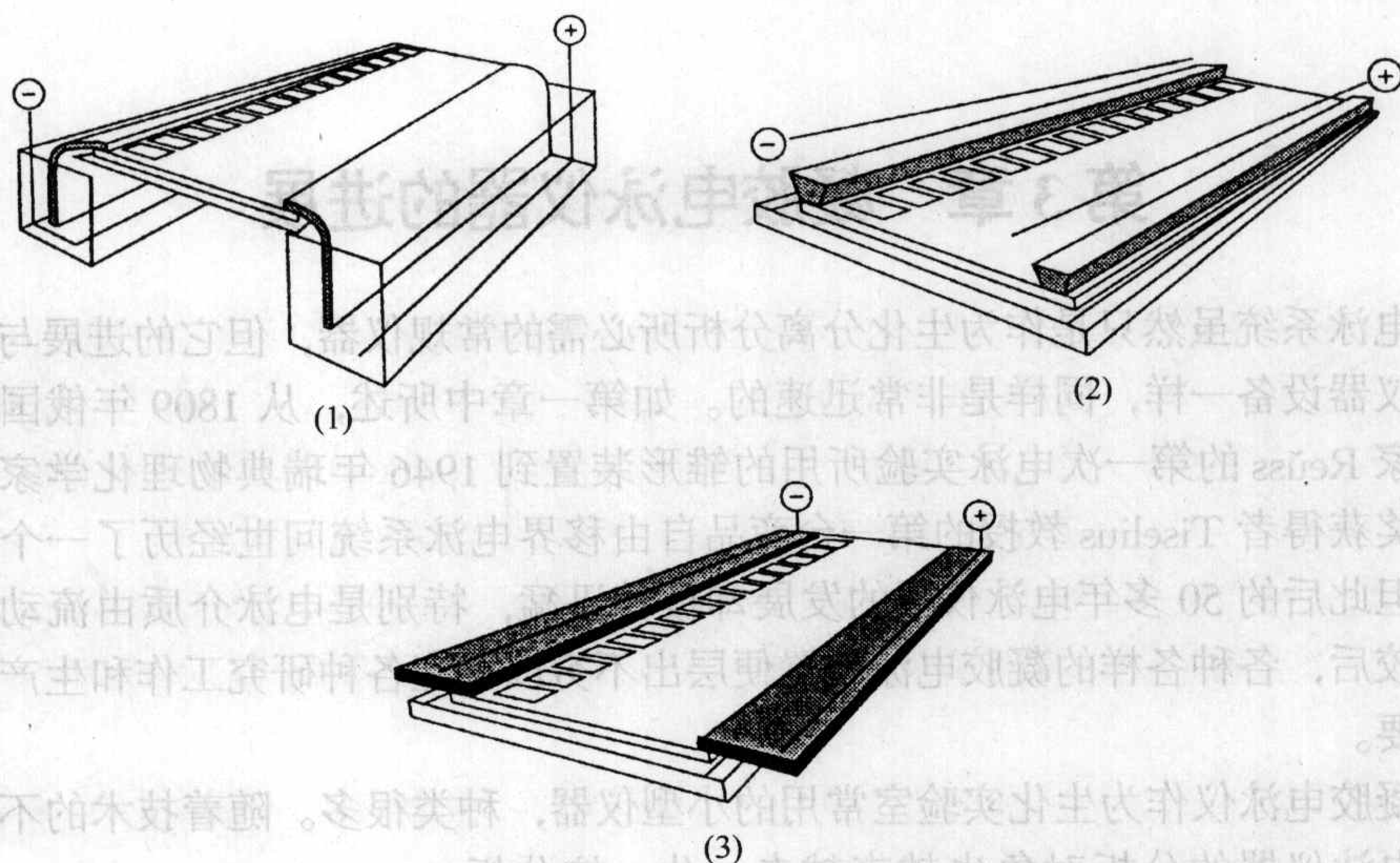


图 3.2　水平电泳时凝胶和缓冲液的接触方式[2]

（1）用滤纸桥；（2）用凝胶条；（3）用滤纸条

可以有效地使用电场，但在装置设计上有一些困难，如液体泄漏，电安全和操作麻烦等问题。水平板状电泳槽大多通过间接方式，以前用滤纸桥搭接，现在可使用缓冲液制作的凝胶条和滤纸条搭接，即半干技术，后种方式使装置简化，操作也大大方便。

3.1.1　圆 盘 电 泳

圆盘电泳（disc electrophoresis）也称管状凝胶电泳。商品仪器于 1959 年问世。用这种形式的装置分离后，样品带的形状酷似圆盘，故称之。它的另外一个意义是圆盘电泳通常是一种不连续电泳，而不连续电泳的英文前 4 个字母也是 disc。但实际上连续体系的管状电泳也可以得到圆盘状的分离区带。

圆盘电泳仪通常有上、下两个电泳槽和带有铂金电极的盖。电极到各凝胶管中心的距离应该相等，以保证凝胶管之间的电场强度一致。上电泳槽中具有若干孔。孔不用时，用硅橡皮塞塞住。要用的孔配以可插电泳管（玻璃管）的硅橡皮塞。电泳管的内径早期为 5～7mm，为保证冷却和微量化，现在则越来越细。电泳管的长度早期为 65～70mm，为提高分辨率，现在则越来越长。电泳管应选用低碱化玻璃管，且要求内径均匀一致，以保证结果的可比性。玻璃管口不宜用火烧平，应用金刚砂磨平管口，以便于电泳后凝胶的取出。玻璃管要用洗液浸泡，用蒸馏水淋洗后，再在管中滴入丙酮，干燥备用。Davis[3]建议在蒸馏水淋洗后，

滴入 Kodak Photo F10 溶液（非离子去污剂）再干燥。塑料管不宜使用，因为管壁会吸附样品中的蛋白。为了保证在电泳过程中凝胶的冷却，在下电泳槽中常有供冷却的装置。

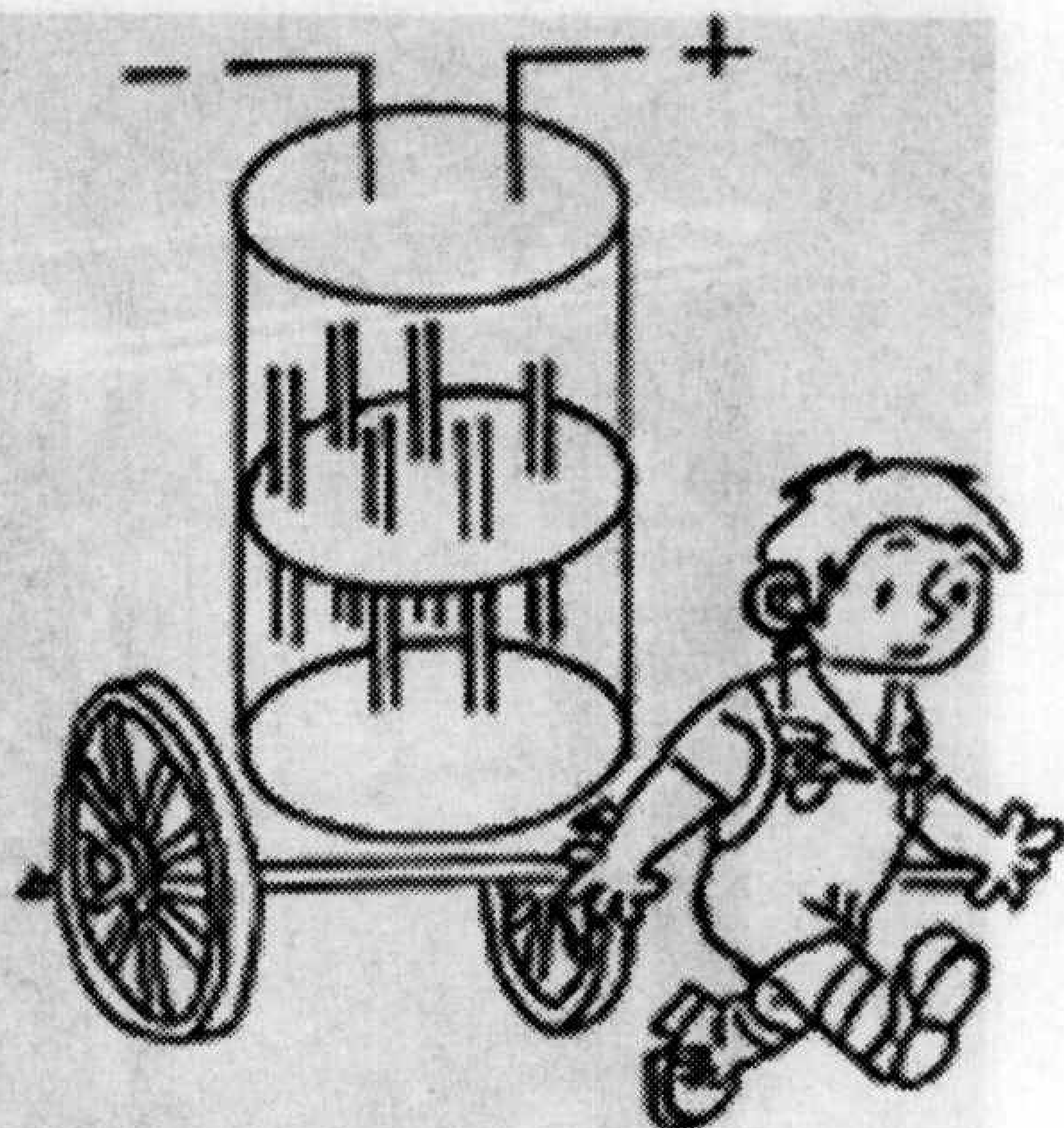


图 3.3　圆盘电泳

20 世纪 50～60 年代常用的圆盘电泳由于灌胶的玻璃管直径不均匀，使同样体积的凝胶溶液聚合在管中的长度不同，而不同的样品是加在不同的玻璃管中，因而在比较样品迁移率时将由于凝胶长度的不同而影响结果的准确性。而且玻璃管中的凝胶不易放冷却，故电场电压不能过高，这将使电泳的速度和分辨率受到影响。电泳后，凝胶难以从玻璃管中取出进行染色和保存。所以这是一种加样数少、速度慢、分辨率差、费精力的“少、慢、差、费”技术。只在某些特殊需要时使用。见图 3.3。

3.1.2　垂直电泳

垂直平板电泳槽的基本原理和结构与圆盘电泳槽基本相同。差别只在于制胶和电泳不在电泳管中，而是在两块垂直放置的平行玻璃板中间。与圆盘电泳相比，由于胶板表面积大，易于冷却而提高了分辨率。且由于冷却均匀，使分离的区带平直。其较大的优点是可在同一块凝胶板上同时比较多个样品，而保证结果的准确和可靠，且电泳后易于取出凝胶干燥保存或作电泳后的各种鉴定，如免疫固定，放射自显影等。

垂直平板电泳槽一般包括上、下各一个缓冲液槽。上面的缓冲液槽用于盛缓冲液和电泳时支撑凝胶板。下面的缓冲液槽除了盛缓冲液外，还用于支撑上面的缓冲液槽和冷却系统。电极由铂金丝制成，在安全盖上有两个接头与电源相连。根据可以同时电泳凝胶的数目可分为单板，双板和多板电泳槽，见图 3.4。

根据对凝胶板的冷却方式，垂直平板电泳槽可分成“开放式”和“封闭式”两种。前者是将载胶的玻璃板暴露在空气中，利用冰箱的冷空气散热。后者又称“夹芯式”，是在电泳槽中装有热交换系统（如弯曲的玻璃管）与外循环水浴相连，用于带走电泳时在凝胶上产生的热。前者效果不佳，故目前大多使用“夹芯式”垂直电泳槽。且很多“夹芯式”垂直电泳槽也可用于作圆盘电泳。

垂直平板电泳从 20 世纪 70 年代以后被国内外生化实验室广泛使用，现在虽然有水平电泳槽与此媲美，但仍不失为主要电泳形式之一。市场上有各种可以放

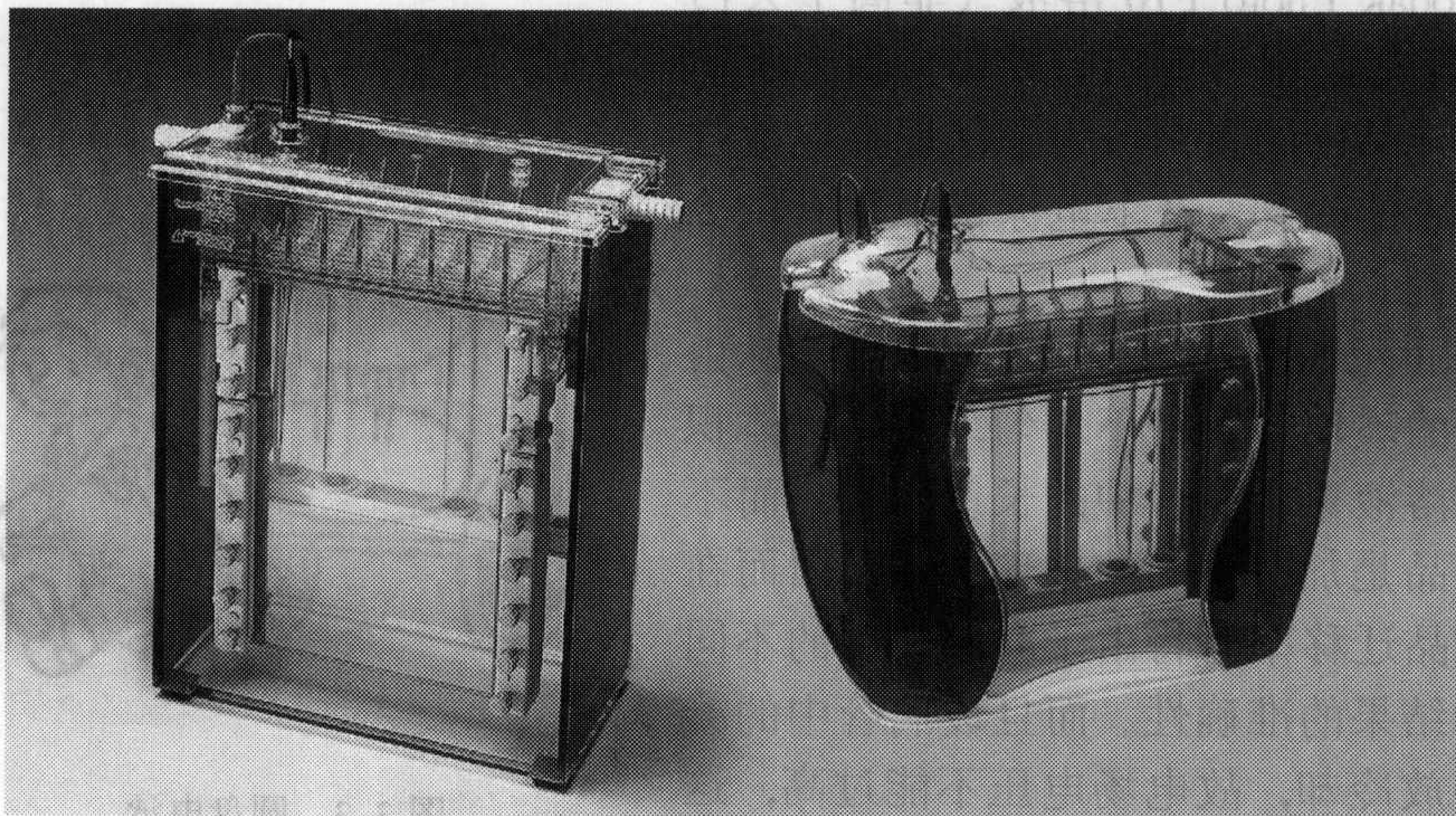


图 3.4　垂直电泳仪

置不同凝胶数目、凝胶面积和厚度的电泳槽可被选择。通常分微型、中型和大型三类。GE 医疗集团，安玛西亚公司的微型垂直电泳槽凝胶厚度可薄至 0.75mm 和 0.5mm。电泳槽结构紧凑，冷却效率高，电泳速度比常用的垂直电泳槽快 3～5 倍左右，并且只需 300ml 缓冲液。

随着蛋白质组学研究的需要，垂直电泳仪又发展到了一个新的高度。各公司都开发了一次可以同时电泳 6～12 块凝胶，以便取得更多的蛋白质样品量进行质谱分析，同时也满足了蛋白质组学研究高通量的需要。这对像药物开发这样的大规模蛋白质组分析是十分有利的。如 GE 医疗集团，安玛西亚公司有一次可电泳



图 3.5　GE 医疗集团，安玛西亚公司的 Ettan DALT six 大型垂直电泳系统



图 3.6　GE 医疗集团，安玛西亚公司的 Ettan DALT twelve
大型垂直电泳系统

6 块凝胶的 Ettan DALT six 大型垂直电泳系统和一次可电泳 12 块凝胶的 Ettan DALT twelve 大型垂直电泳系统（凝胶尺寸均为 26cm × 20cm），见图 3.5 和 3.6。

3.1.3　水平电泳

水平电泳槽的形状各异，但结构大致相同。一般包括电泳槽基座、冷却板和电极，有的还包括安全盖。目前电泳槽基座常常包括分置于两侧的缓冲液槽，用于进行常规聚丙烯酰胺、琼脂糖、SDS、免疫和双向电泳时滤纸桥的搭接。但随着半干技术的发展，今后的电泳槽就不必需要缓冲液槽而会变得更简便[4]。

水平电泳槽的关键在于冷却板。冷却效果好，凝胶在冷却板上得到充分的冷却，使得可以在凝胶上加高电压，所以大大缩短电泳时间和提高分辨率。现在冷却板有两种：一种是做成中空，与外部循环水浴相连；另一种是半导体冷却系统。

水平电泳槽的铂金丝电极由过去的固定型改变成现在的可移动型，给操作者带来很多的方便，这样便不受灌制凝胶尺寸的限制，可大可小，可长可短。

市售水平电泳仪的种类很多。其中 1973 年问世的原瑞典 LKB 公司的多用电泳仪（Multiphor)(图 3.7)，由于其功能多、质量可靠、技术先进、操作方便等原因至今仍然为实验室所青睐。1986 年原瑞典 Pharmacia 公司推出的全自动、多功能、快速水平电泳系统(PhastSystem)(图3.8)可谓是新一代仪器，代表了当时凝胶电泳仪器的水平。这个系统分为两个部分：电泳和控制单元（这个单元包括

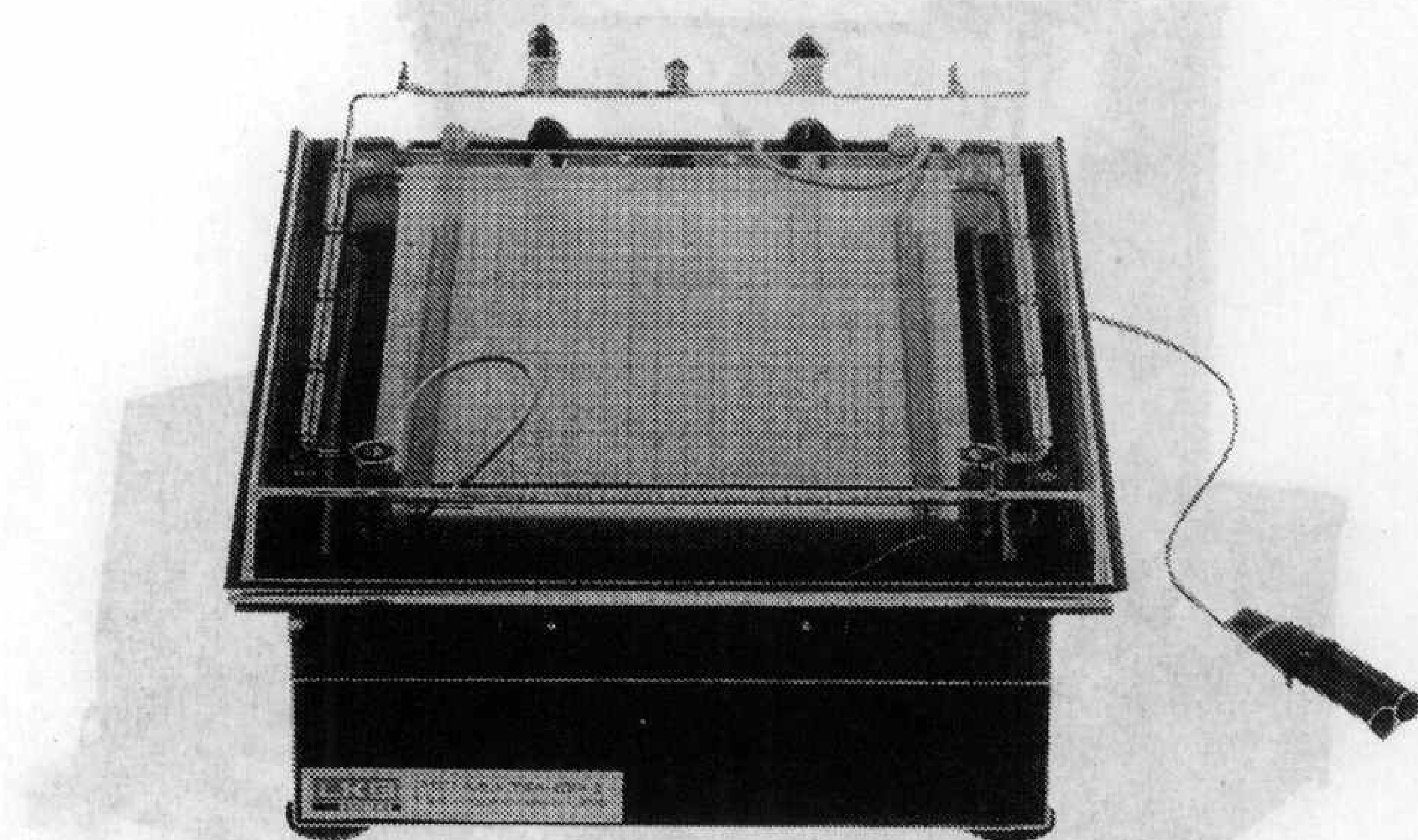


图 3.7　原瑞典 LKB 公司的多用电泳系统（Multiphor）



图 3.8　原瑞典 Pharmacia 公司的全自动多功能快速水平电泳仪（PhastSystem）



图 3.9　GE 医疗集团，安玛西亚公司 Ettan IPG phorⅡ等电聚焦系统

了电泳槽，电源和半导体冷却装置）以及染色单元，见图 3.8。整个仪器结构紧凑、小巧，仅重 10.5kg。并且电泳过程，包括固定、染色和脱色全部由微机自动化控制，改变了过去电泳实验长期使用手工操作的状态，该仪器使用半干技术，操作极为简便和快速，并保证了实验的可重复性。

由于蛋白质组学分析技术对高分辨率的需要，20 世纪 90 年代末作为双向电泳第一向的固相 pH 梯度等电聚焦电泳仪闻世。由于固相 pH 梯度技术需要极高的电压（几千伏），所以必须采用水平平板电泳方式，见图 3.9。

3.1.4 垂直与水平平板电泳的比较

凝胶电泳仪器发展至今，虽然仍然以垂直电泳和水平电泳作为主要方式，但后者由于具有较多的优点而代表着发展的方向[5]。其主要优点有：

（1）分辨率高　这是电泳最主要的指标。水平电泳方式由于容易使凝胶冷却（因为凝胶是直接铺在冷却板上，而不像垂直电泳那样夹在玻璃板之间），便可以加高电压，所以可使分辨率提高。特别是在等电聚焦电泳时，通常需要几千伏电压，故应采用水平方式。另一个原因是凝胶尺寸不受限制，可以用增加分离距离来提高分辨率。

（2）速度快　与上述同样的原因，水平电泳的速度比圆盘电泳和垂直电泳要快。如常规聚丙烯酰胺凝胶电泳和 SDS 电泳，在使用半干技术时，全自动水平电泳方式只要 30～40 分钟[6,7]，半自动水平电泳也只要 1 小时左右[8]，而圆盘电泳和垂直平板电泳一般需要 4～8 小时[9]。

（3）准确度高　由于垂直电泳和水平电泳克服了圆盘电泳管径不均匀引起的凝胶长度的不一致所导致区带迁移距离比较时的误差，从而保证了迁移率、分子质量或等电点测定的准确性。

（4）灵敏度高　通常水平电泳可使用薄胶，这不但可以节省凝胶和有关介质，如昂贵的载体两性电解质，而且只需加少量样品，因而提高分析灵敏度。

（5）凝胶厚度、尺寸和分离距离任选　由于垂直电泳的上、下电泳槽和电极位置是固定的。所以无法选择凝胶厚度、尺寸和分离距离。这样就给制胶带来了限制。

（6）凝胶层薄　电泳时在凝胶中几乎没有温度梯度，可以保证蛋白带的平直。

（7）加样数、加样位置任选，加样方便，易于自动化　垂直电泳通常在加样梳制成的凝胶孔中加样，因而受到了数目和位置的限制。水平电泳是在凝胶表面上加样，数目和位置便可根据需要而定，这对等电聚焦电泳特别有利。因为等电聚焦电泳时，样品最好加在靠近等电点的位置。

（8）染色快、效果好　平板胶，特别是薄层胶染色和脱色快，并且提高灵敏

度。

(9) 等电聚焦时可以在凝胶表面上直接测定 pH 梯度

(10) 便于保存　圆盘电泳的致命弱点之一是结果保存困难，只能照相保存。垂直平板电泳的凝胶除了可用照相保存结果外，需要用凝胶干燥器干燥保存。否则自然干燥凝胶在几个月后便会龟裂。水平电泳通常用薄胶，只要用甘油浸泡后自然干燥[10]，即使长期保存也不会龟裂。

(11) 便于制成多功能方式　水平电泳系统可以做各种凝胶电泳，如常规聚丙烯酰胺凝胶电泳、SDS 电泳、电泳转移、等电聚焦电泳、双向电泳、免疫电泳和滴定曲线等。但使用圆盘电泳和垂直电泳，后四种电泳方法便受到限制。而且使用水平平板电泳既可以做阳极电泳，也可以做阴极电泳[9]。

(12) 便于使用半干技术　电泳技术在 80 年代末、90 年代初的一个比较重要的改进是使用半干技术。它一改过去在电泳时使用大量缓冲液（几百至几千毫升）而变为使用少量缓冲液（几毫升至几十毫升），使电场通过凝胶。这样不但节省实验材料，使操作大大简化，而且还大大提高了电泳速度[6,8,10]。电泳转移也可以使用半干技术。但目前只有水平电泳系统才可以使用半干技术。

由于人们习惯于垂直电泳，所以至今仍被普遍采用作为常规聚丙烯酰胺凝胶电泳和 SDS 电泳的首选。但是由于等电聚焦电泳需要高电压，故应采用水平方式，特别是当前蛋白质组研究需要的固相 pH 梯度等电聚焦必须采用水平平板方式。

3.2　各种灌胶模具

灌胶模具是电泳系统中比较重要的部分，各种不同电泳方法需要不同的灌胶模具。垂直电泳所需的平板凝胶一般都是用两块平整的厚玻璃板来灌注。两玻璃板之间用隔条隔开，再用夹子夹紧。为防止渗漏，隔条上涂一层真空硅酮油或用 2% 琼脂等封住。玻璃板大小和隔条厚度根据电泳槽的设计而定。灌胶后，将梳子插入凝胶液顶部，以使聚合后在凝胶顶部形成凹槽，用于加样。梳子的深度和宽度应与玻璃板大小相应，梳子厚度则应与凝胶板的厚度一致。如需灌注梯度胶，还需使用梯度混合器。

用于水平电泳的常规聚丙烯酰胺凝胶和 SDS 凝胶的灌制，因浓缩胶和分离胶的需要，也必须垂直灌制，结构与垂直电泳所用的模具类似，只是不加梳子。

载体两性电解质等电聚焦电泳所用的凝胶灌胶模具比较简单。一般也是用两块玻璃板和隔条制成，但只要水平放置将凝胶灌入便可，没有泄漏的危险[15]。但如灌注固相 pH 梯度等电聚焦电泳所用的凝胶必须垂直灌注，并用梯度混合器。

用于免疫电泳的琼脂糖凝胶灌胶最为简便。可以用两块玻璃板和隔条制成的

模具，水平放置灌入，或在水平位置放一块玻璃板，将一定量的琼脂糖倒在玻璃板上便可。用以上模具的灌胶方法见以下各章。

3.3 电　源

要使荷电的生物大分子在电场中泳动，必须加电压，且电泳的分辨率和电泳速度与电泳时的电参数密切相关。电泳用的电源式样很多，发展很快。从表头显示到数字显示；从参数的手调设置到微机的程序控制；从单恒、双恒到三恒电源；使性能越来越稳定，操作越来越简便。

不同的电泳技术需要不同的电压、电流和功率范围，所以选择电源主要根据电泳技术的需要。如等电聚焦需要较高的电压。载体两性电解质等电聚焦需要1000～2000V电压，而固相pH梯度等电聚焦则需要3000～10 000V电压。聚丙烯酰胺凝胶电泳和SDS电泳只需要100～600V电压。电泳转移则需要低电压、大电流（几百毫安至几十安）、电泳方式（圆盘、垂直、水平）和凝胶大小对电源的要求也不同，也是选择电源的参考因素。

所谓三恒电源是指在电泳过程中根据电泳方法的需要使电压、电流和功率中的某一项参数达到设置上限后保持恒定状态而自动改变另外两项，不需人工调节，从而方便了操作。

迁移率的不同提供了从混合物中分离物质的基础，迁移距离正比于迁移率。所以在不同实验中，它们的比较应该在相同的时间和电场强度下进行。如果条件相同，则第二个实验用第一个实验的双倍电压和一半时间时，迁移距离应该相等。但实际上由于系统中其他因素的干扰不可能完全相等，但如用这两个因子的乘积，则可寻找电泳分离的条件。所以电源采用“伏·小时”而不单纯采用“小时”作为电泳参数是可取的。

3.4 外循环恒温系统

提高电泳分辨率的措施之一是加大凝胶上的电场强度，但过高的电压在电泳过程中会在凝胶上产生过量的热，而导致烧胶，所以电泳时凝胶的温度是提高分辨率的限制因子。另外电泳时凝胶中温度的不均匀分布会使电泳带不平直。所以温度对电泳也是一个重要的影响因素。

冷却凝胶温度目前有两种方式：一种是在凝胶板下装有半导体冷却装置；另一种是在电泳槽中用冷却管或冷却板与外恒温循环系统相连。对循环系统的要求是温度稳定，流量大。国内外现在均有这类恒温水浴可供选用。原瑞典Pharmacia Biotech公司在1996年推出一种环保型的恒温水浴。

3.5 自动凝胶染色仪

通常凝胶的固定、染色和脱色程序是冗长和繁琐的。并且每次染色的固定、染色、脱色时间，温度、振荡频率难以控制，使得定量结果的准确性和重复性难以得到保证。3.1.3 节中所述的 PhastSystem 不但可以快速染色（考马斯亮蓝，0.5 小时；银染色，1 小时）还因为采用自动程序控制可以保证结果的准确性和重复性。

现在为了蛋白质组学研究对定量结果重复性的严格要求，各公司纷纷推出自动凝胶染色仪。

3.6 凝胶干燥仪

凝胶干燥仪用于电泳和染色后的凝胶的干燥，以便保存结果备查。对厚度在 1mm 以上的凝胶，需使用凝胶干燥仪，以免凝胶日后龟裂。但现在一般使用的薄层和超薄层凝胶，并不需要凝胶干燥仪，只需用甘油脱水后自然干燥保存。

目前市场上的凝胶干燥仪主要有两种形式：一是采用热空气干燥；另一是采用真空干燥。凝胶可被干燥成透明状，也可以干压在滤纸上。如 GE 医疗集团、安玛西亚公司的 GD 2000 真空凝胶干燥系统。

3.7 电泳转移仪

电泳转移即电泳印迹。它是利用低电压大电流的直流电场使凝胶电泳后的条带或电泳斑点转移到特定的膜上，如硝化纤维素膜、PVDF 膜、重氮化纸和阳离子尼龙膜等。这就等于将一次电泳的结果拷贝成几份，再各自进行蛋白质、同工酶、放射自显影或免疫检测等，大大提高了效率，是当前分子生物学研究的热门仪器。

目前国内外电泳市场上的电泳转移仪种类繁多。从用途上区分，可分为用于核酸转移和蛋白质转移两大类。前者，现在主要采用真空转移。用于蛋白质的电泳转移仪分为垂直和水平两种形式。垂直方式是把电泳后的凝胶，硝化纤维素膜（或其他膜）和滤纸组成“三明治”夹在海绵中，浸泡在盛有几百毫升至几千毫升缓冲液的转移槽中，见图 3.10。水平方式大多是半干式转移槽。只要用几毫升至几十毫升的缓冲液浸湿转移膜和滤纸，组成“三明治”夹在作为阴、阳极的石墨电极中进行，见图 3.11。半干式转移效率高、速度快、操作简便并且节省实验材料。

电泳转移仪的结构也有两种方式：一种是转移槽和电源自成一体；另一种是

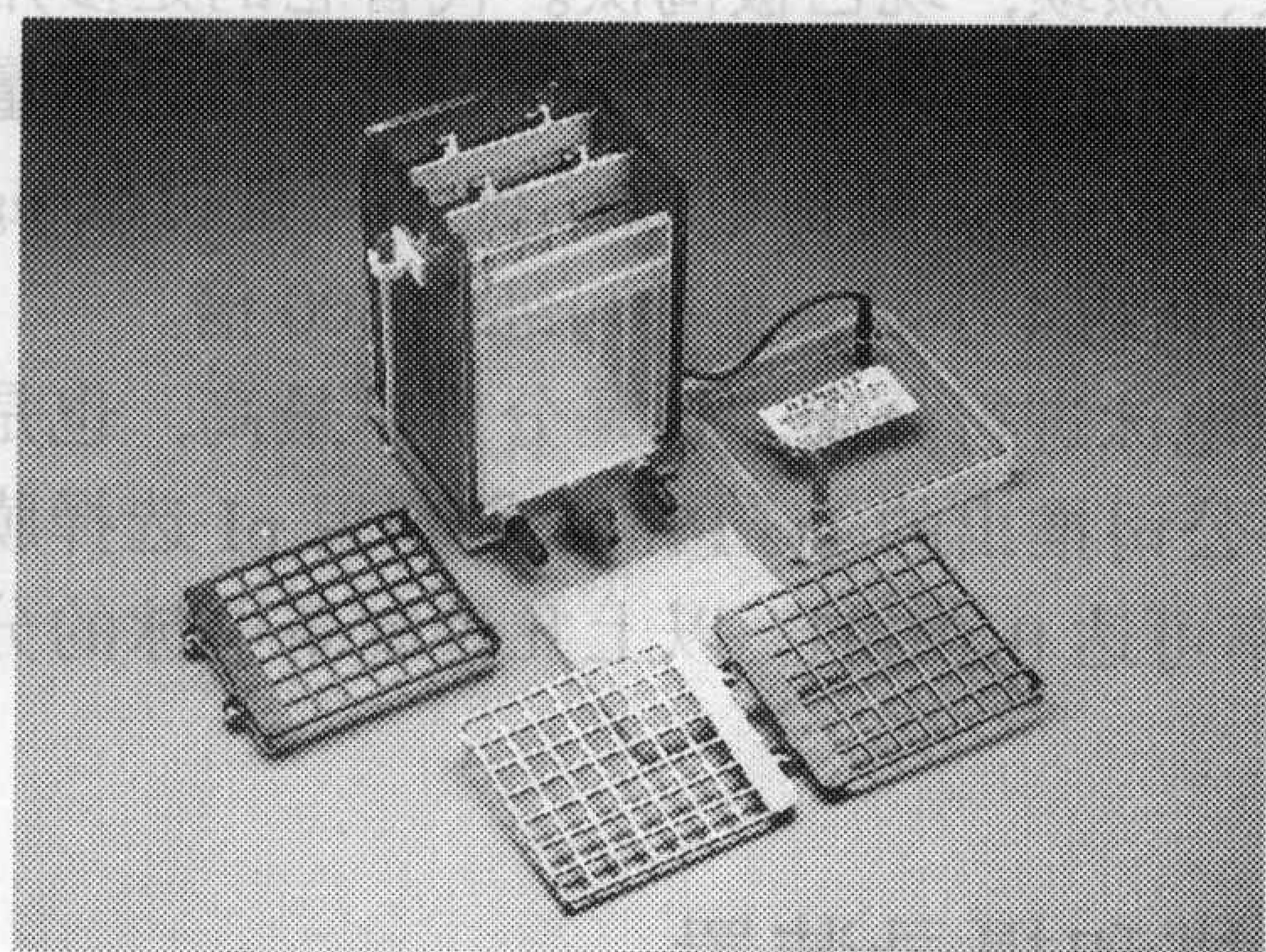


图 3.10　微型电泳转移仪

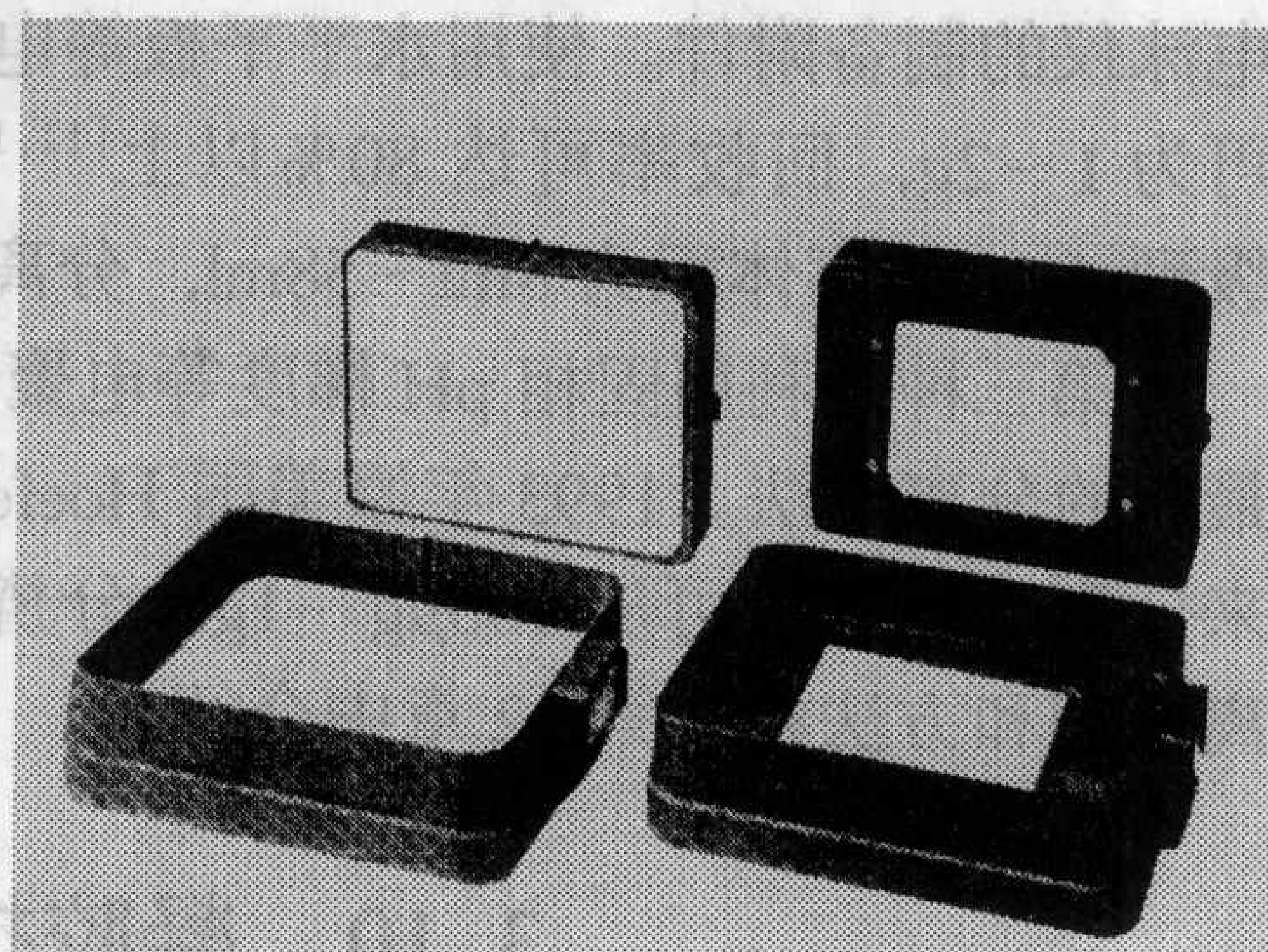


图 3.11　半干电泳转移仪

转移槽只作为电泳槽的附件，电源则使用电泳用的电源。后者作为附件又不带电源，价格就比较低廉了。如原瑞典 LKB 公司 Multiphor 的 Nova Blot 转移附件便是这种方式。

3.8　电泳洗脱仪

从凝胶板上洗脱蛋白样品是非常麻烦和费时的，且回收率很低。利用带负电的生物大分子向阳极移动，可在阳极用透析膜收集样品。

全凝胶洗脱仪能在 15～20 分钟内实现快速，可重复性洗脱，可容纳的凝胶厚度达 3.0mm，平均回收率在 70%以上（取决于不同应用）。还可以根据缓冲系统的不同，用于洗脱或透析蛋白。样品收集量可为 400～600μl。能同时用于 1～6 个样品在 3～5 小时内完成洗脱。

3.9　制备电泳仪

理想的制备电泳仪应具有分辨率高、分离量范围大、回收率高、速度快、操作简便以及不改变样品的物理化学性质和生物学特性等特点。

目前国外市场上制备电泳的形式根据分离原理可以分成三种：一种称为连续洗脱凝胶电泳。它是利于常规聚丙烯酰胺凝胶电泳、SDS 电泳或琼脂糖电泳来进行分离。据称能分离分子质量只有 2%差别或等电点相差 0.1pH 单位的蛋白。它需要的附属设备是电源、蠕动泵、部分收集器等。

第二种制备电泳是利用载体两性电解质等电聚焦来进行分离纯化。它的分辨率比第一种方式要高，并且蛋白不变性。最早的仪器是在 70 年代中期，原瑞典 LKB 公司的柱状等电聚焦制备电泳仪。使用蔗糖密度梯度作为支持介质，用载

体两性电解质形成 pH 梯度。但操作冗长、烦琐，现已被淘汰。代替它的是多用电泳仪的制备附件。使用水平平板等电聚焦制备，不但操作大大简化，且分离量可为 1～2g，回收率可达 80%以上[11,12]，Rotofor 制备电泳系统分离量可从 μg 级到 4g，分离体积为 8ml～58ml，分离时间约 4 小时，据称可纯化 500 倍。

第三种是利用固相 pH 梯度等电聚焦电泳进行分离。这是分辨率最高，也是最新的分离方法。1993 年原美国 Hoefer 公司推出的 Iso Prime 是利用 pI 选择膜来分离。分离量可从 100μg～1g。分辨率可达 0.01pH。以上几种制备电泳的分离原理和方法将在第 12 章中介绍。

3.10 凝胶扫描和摄录装置

凝胶扫描仪主要用来对样品单向电泳分离后的条带和双向电泳后的斑点进行扫描，从而给出定量的结果。凝胶扫描仪的设计原理和结构与分光光度计基本一致。有的分光光度计还带有凝胶扫描附件。各公司均有凝胶扫描仪供选择。

凝胶扫描仪的基本结构与常规分光光度计一样也分为光源、单色器（或滤光片）、样品室、光电倍增管以及控制和结果显示部分。所不同的只是凝胶扫描仪的样品室设计是专门用来放置凝胶板或凝胶条（或层析板）的。放置凝胶的样品台常常由马达控制，并以不同速度移动，使欲扫描的条带或斑点移入光路。另一种方式是固定样品台、移动扫描探头，从而进行定量测定。

凝胶扫描仪视所用光源的不同具有不同的功能。采用紫外光源（如氘灯）的扫描仪可以用紫外波长扫描不经染色的凝胶。只有可见光源（如碘钨灯）的扫描仪，则凝胶必须染色后才能扫描。如果用激光光源，通常也只能扫描染色后的凝胶。但由于激光光源强度大、单色性好，可大大提高凝胶扫描的灵敏度和分辨率。

凝胶扫描仪视光路结构不同，它的功能也不同。如用滤光片作单色器，只能在滤光片的透过波长范围内使用。如用光栅单色器，则波长可以任选。也就可以扫描各种颜色的凝胶。

凝胶扫描仪视光路结构的不同，可以有不同的测定方式。如果是常见的紫外-可见分光光度计的直线结构[13]，则只能作透射方式的测定。如果在此基础上改变光束方向，则可作反射测量。这样便可扫描不透明的电泳转移膜、层析板等。如果是直角结构[14]，则可作荧光测量。适合于用荧光染料染色的凝胶。荧光测量的灵敏度最高。由于荧光技术为蛋白质组学研究带来高重复性、高灵敏和高通量的可能，所以各种可用于荧光测量的成像系统应运而生，如 GE 医疗集团，安玛西亚公司 4 种型号的 Typhoon 高性能凝胶和印迹成像系统，图 3.12 为其光路图。

随着计算机技术的发展，到了 20 世纪 80 年代，从凝胶扫描仪得到的图谱可

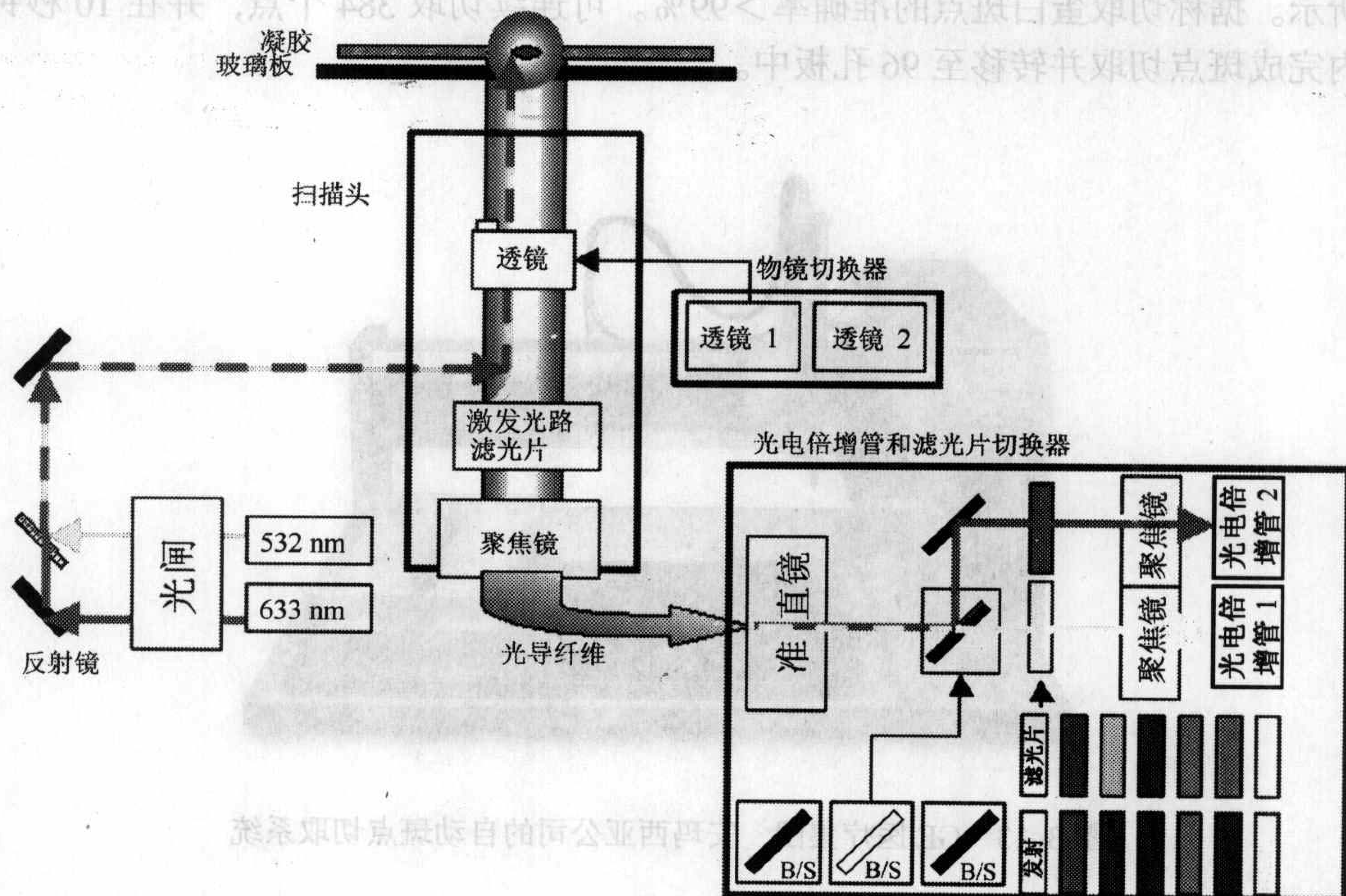


图 3.12 Typhoon 高性能凝胶和印迹成像系统的光路图

在计算机上进一步进行数据加工处理，大大提高了数据分辨率、准确度和灵敏度，特别在背景扣除、积分方法等数据处理上可以根据凝胶的脱色情况来选定。从而使测量结果更加接近真实值。近十多年来软件功能方面的发展实际上比凝胶扫描仪本身的发展更迅速。

凝胶定量分析的另一种装置是用带有电荷耦合装置的摄像系统（CCD Camara System）将凝胶图谱摄制下来，然后将信息数字化，并转移到计算机中再进行分析。这种新的凝胶定量测定仪器不但快速，简便而且价格低廉。不但可作蛋白定量，而且可作核酸的定序和定量。不但可作透射、反射而且可作荧光和放射自显影测量。是当前各种新技术的交融在电泳定量应用上的结晶。但是一般来说它的分辨率低于激光扫描仪。

3.11 从双向电泳凝胶中自动切取蛋白斑点的仪器

双向电泳的凝胶染色后，经过扫描和图像处理，为了对感兴趣的蛋白斑点进行进一步的质谱或其他分析，可用自动切取蛋白斑点的仪器将斑点挖出，并按程序放在 96 孔板中再将蛋白酶解，以供质谱仪进行 MALDI-TOF 分析以得到蛋白质氨基酸序列或肽图。GE 医疗集团，安玛西亚等公司均有此类装置，见图 3.13

所示。据称切取蛋白斑点的准确率＞99%。可连续切取 384 个点，并在 10 秒钟内完成斑点切取并转移至 96 孔板中。



图 3.13　GE 医疗集团，安玛西亚公司的自动斑点切取系统

为了加速蛋白组学的研究进程，高通量分析设备正受到人们的关注，GE 医疗集团，安玛西亚公司的 Ettan™全自动蛋白斑点处理工作站可全自动、高效、快速完成双向凝胶蛋白斑点的切取、酶解和点样，直接供 MALDI-TOF 质谱仪检测分析。据称一次可放入 12 块胶，24 小时内处理 1152 个样品，斑点准确切取率大于 99%，见图 3.14。

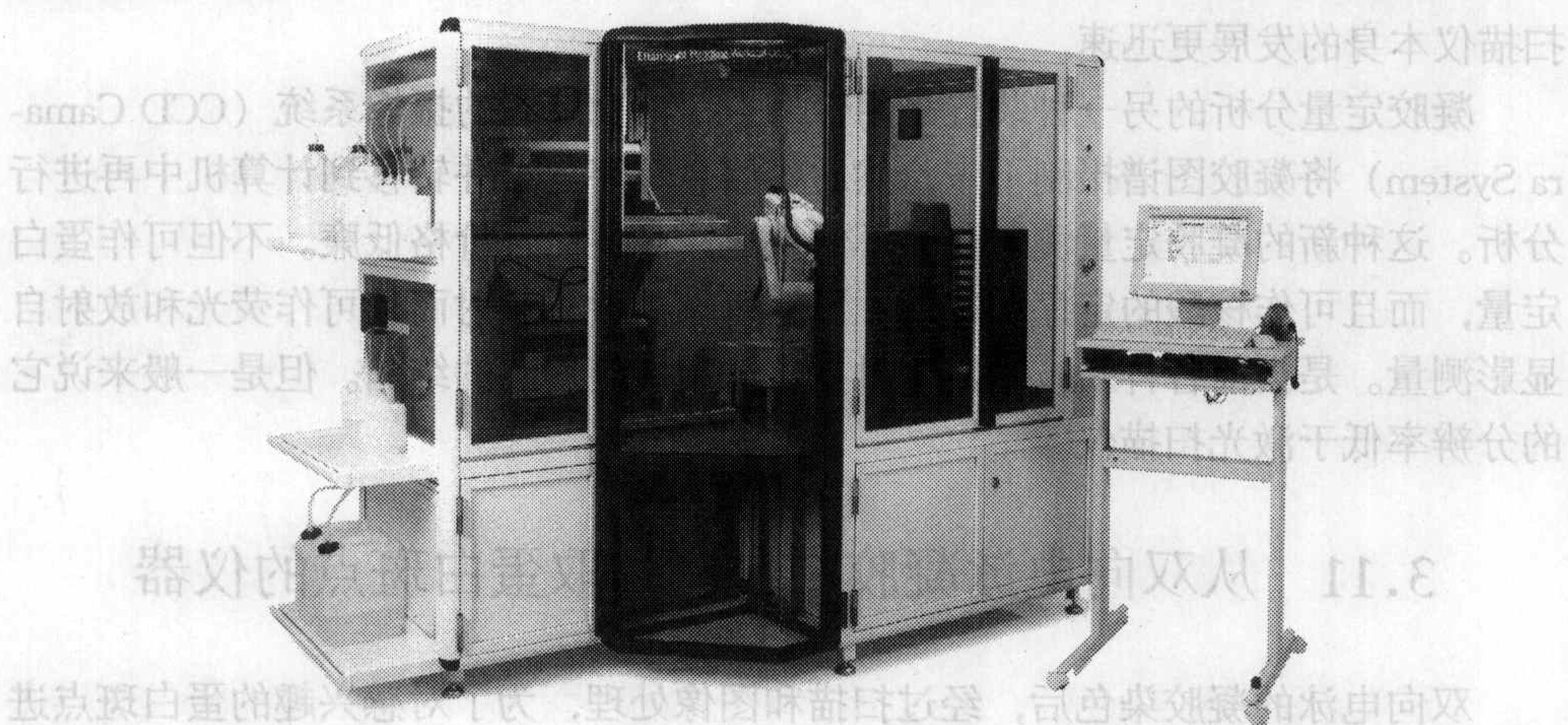


图 3.14　GE 医疗集团，安玛西亚公司的 Ettan™全自动蛋白斑点处理工作站

参考文献

[1] Hames B D, Rickwood D. Gel Electrophoresls of Proteins, Second edition, IRL Press. 1990.9

[2] Acrylamide gel casting hand book. Pharmacia Biotech AB Uppsala, Sweden. 1994. 20

[3] Davis B J. Annals N. Y. Acad. Sci., 1964 (121): 404

[4] 郭尧君. 中国专利. No. ZL972014543, 1998

[5] 郭尧君. 生物工程进展. 1994 (14): 59～61

[6] Guo Yaojun, Lixinhui, Huang Lili. Electrophoresis., 1996 (17): 537～539

[7] Guo Yaojun, Huang Lili, Yao Xuegang, Yu Zhongyi. Electrophoresis., 1996 (17): 535～536

[8] 郭尧君, 余添. 生物化学与生物物理进展. 1996 (23): 360～364

[9] Görg A, Postel W, Westermeier R et al. J. Biochem. Biophys, Methods, 1980 (3): 273

[10] 郭尧君. 生物化学与生物物理进展. 1983 (3): 50～55

[11] 陈红, 郭尧君, 颜茂恭等. 生物物理学报. 1991 (6): 463

[12] 郭尧君. 生物化学仪器指南. 第二册. 色谱仪器. 科学出版社. 1989. 62

[13] 郭尧君. 分光光度技术. 科学出版社. 1987. 55

[14] 郭尧君. 荧光实验技术. 科学出版社. 1978. 49

[15] 郭尧君. 中国专利 No. ZL982188545, 1999

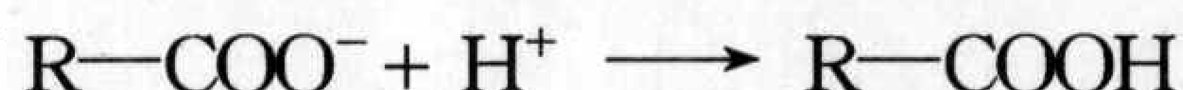
第 4 章　常规聚丙烯酰胺凝胶电泳

常规聚丙烯酰胺凝胶电泳（conventional polyacryamide gel electrophoresis）简称 Native PAGE。它是根据蛋白质分子在缓冲液中的大小，形状以及带电（负电或正电）的多少，在恒定 pH（碱性或酸性）缓冲系统中的分离，主要用于检测样品纯度和测定蛋白分子质量。

4.1 原　理

4.1.1　蛋白质的电泳行为

蛋白质是由不同数量和比例的 20 种 L-α 氨基酸组成的生物大分子。从电泳观点看，蛋白质分子的最主要的特性是它的带电行为。每一种蛋白质分子在一定的 pH 环境中，它的氨基酸侧链基团或结合质子或解离而带正电或负电。例如在低 pH 时，天冬氨酸和谷氨酸残基的羧基结合一个质子而不带电。



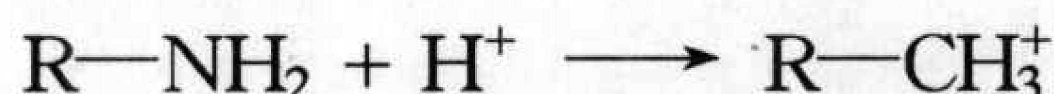
$$R—COO^- + H^+ \longrightarrow R—COOH$$

但在高 pH 时，羧基将解离而变成带负电。



$$R—COOH + OH^- \longrightarrow RCOO^- + H_2O$$

赖氨酸残基的氨基，组氨酸残基的咪唑基，精氨酸残基的胍基，在低 pH 时也结合一个质子，此时它们带正电。



$$R—NH_2 + H^+ \longrightarrow R—CH_3^+$$

但在高 pH 时，这些基团将被解离而不带电荷。



$$R—NH_3^+ + OH^- \longrightarrow R—NH_2 + H_2O$$

蛋白质的净电荷是组成它的氨基酸残基的侧链基团上所有正，负电荷的总和。它的净电荷决定于它的环境的 pH，这可以由蛋白质的滴定曲线（净电荷-pH 曲线，见图 4.1）来说明。

在低 pH 时，蛋白质的净电荷是正的。而在高 pH 时，它的净电荷是负的。且离等电点越远，荷电越多。但在某一 pH，滴定曲线和横坐标相交，蛋白质在此 pH 溶液中的净电荷是零，此 pH 即为蛋白质的等电点 pI。蛋白质的等电点仅决定于它的氨基酸组成，是一个物理化学常数。每一个蛋白质或多肽是由不同数目和比例的氨基酸组成的，因此蛋白质的等电点范围很宽。有一种α-酸性糖蛋白(chimpanzee)，它的 pI 低达 1.8，而人胎盘溶菌酶的 pI 高达 11.7。这样一个宽

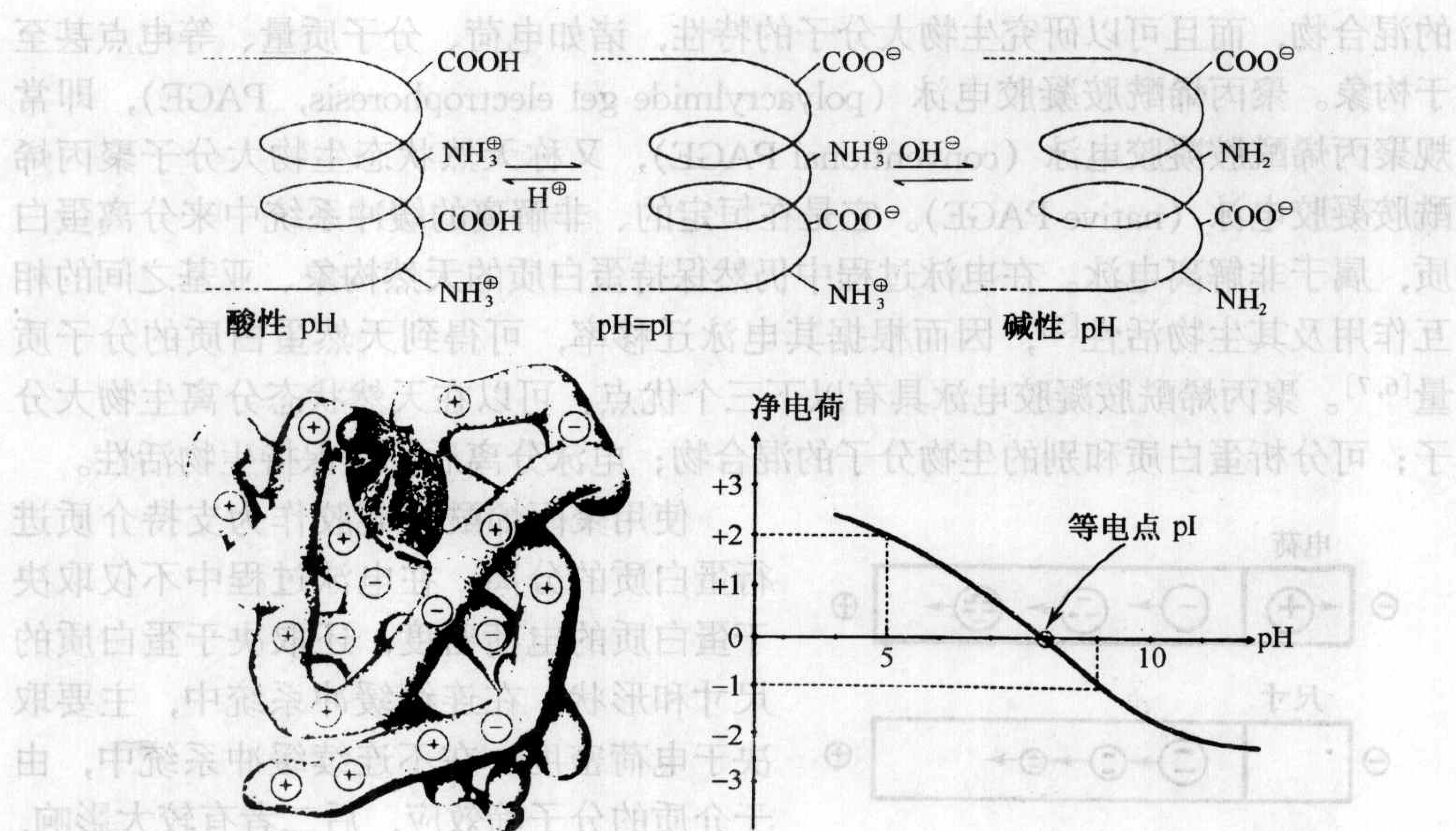


图 4.1　蛋白质的滴定曲线

广的等电点范围使得可以利用它来进行蛋白质的分离和分析。蛋白质分子的大小，形状，活性，免疫性能等也各不相同。根据蛋白质分子的这些物理化学特性，便可以使用各种不同原理的电泳方法和介质来探求蛋白质分子的各种生化特性，如分子质量、等电点、亚基数、电荷分布、酶活性、免疫行为等。

4.1.2　原　　理

近 50 年来，固体支持介质可分为两类：一类如纸、醋酸纤维素薄膜等。它们是化学隋性的，能将对流和扩散减到最小。用这些介质分离主要是基于蛋白质的电荷密度。另一类是淀粉、琼脂糖和聚丙烯酰胺凝胶。它们不仅能防止对流，把扩散减到最小，并且它们是多孔介质，孔径大小和生物大分子具有相似的数量级，能主动参与生物分子的分离，具有分子筛效应。但淀粉凝胶由于其批号之间的质量相差大，很难得到重复的电泳结果，且胶层厚、分辨率低、电泳时间长、操作麻烦，已很少使用。琼脂糖凝胶孔径较大，对大部分蛋白质只有很小的分子筛效应。

自从 1959 年 Raymond 和 Weintraub[1] 首次使用聚丙烯酰胺作为电泳的支持介质，特别是 60 年代初 Hjertèn[2]、Ornstein[3] 和 Davis[4] 发表他们的不连续电泳系统的基础工作以来，聚丙烯酰胺凝胶已成为目前生化实验室最常用的支持介质。由于它的分子筛效应，提高了电泳分辨率，不仅能分离含有各种大分子物质

的混合物，而且可以研究生物大分子的特性，诸如电荷、分子质量、等电点甚至于构象。聚丙烯酰胺凝胶电泳（polyacrylmide gel electrophoresis，PAGE），即常规聚丙烯酰胺凝胶电泳（conventional PAGE），又称天然状态生物大分子聚丙烯酰胺凝胶电泳（native PAGE）。它是在恒定的、非解离的缓冲系统中来分离蛋白质，属于非解离电泳。在电泳过程中仍然保持蛋白质的天然构象、亚基之间的相互作用及其生物活性[5]，因而根据其电泳迁移率，可得到天然蛋白质的分子质量[6,7]。聚丙烯酰胺凝胶电泳具有以下三个优点：可以在天然状态分离生物大分子；可分析蛋白质和别的生物分子的混合物；电泳分离后仍然保持生物活性。

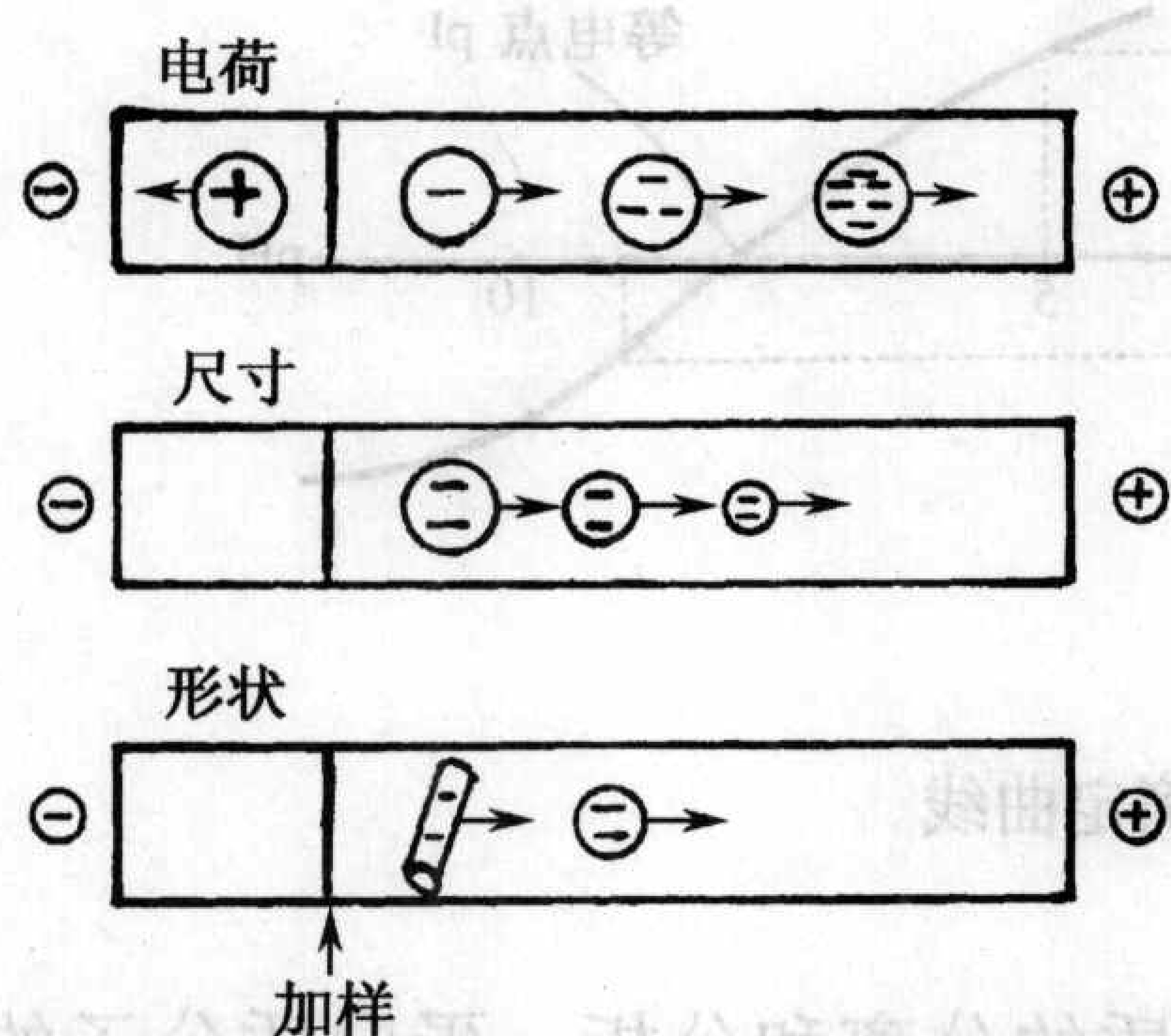


图 4.2　蛋白质分子在常规聚丙烯酰胺凝胶电泳中的分离因素[21]

使用聚丙烯酰胺凝胶作为支持介质进行蛋白质的分离，在电泳过程中不仅取决于蛋白质的电荷密度，还取决于蛋白质的尺寸和形状。在连续缓冲系统中，主要取决于电荷密度；在不连续缓冲系统中，由于介质的分子筛效应，后二者有较大影响，见图 4.2。

聚丙烯酰胺凝胶由于有一定的机械强度和透明度，所以对电泳后结果的保存和扫描处理都极为有利。

常规聚丙烯酰胺凝胶电泳如第 3 章所述，可以用圆盘电泳、垂直电泳或水平电泳来进行。由于水平薄层聚丙烯酰胺凝胶电泳具有较多的优点，特别是使用半干技术后更能显示其优越性，故在本书中拟重点介绍。

4.1.3　缓冲系统的选择

4.1.3.1　pH 的选择

对常规聚丙烯酰胺凝胶电泳缓冲系统选择的首要考虑是保证蛋白质在此系统中的溶解性能、稳定性能以及生物活性的保持，同时要考虑的是电泳时间和分辨率。因为电荷密度是常规聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白质分子的主要根据之一，所以 pH 显得极为重要。理论上聚丙烯酰胺凝胶电泳可在各种 pH 进行。但实际上在过酸或过碱的条件下将发生某种水解反应（如脱酰胺作用），所以 pH 应限制在 3～10之间。为保持天然蛋白质的生物活性，可使用的 pH 范围可能更窄。

如果缓冲液的 pH 选择远离样品中各种蛋白质的等电点，则这些蛋白质分子荷电多，电泳时间就短。且由于扩散减少，电泳带细窄。如果缓冲液的 pH 选在靠近被分离样品的一种或几种蛋白质的等电点，则蛋白质分子之间的电荷密度差别大，也就有较多的机会分离，分辨率就高。pH 的选择常常是这两种对立因素

的权衡考虑，因为将近有半数蛋白质的等电点在 pH4.0～6.5[8]，所以常常使用 pH8.0～9.5 的缓冲液[3,4,9]。为提高酸性蛋白质的电泳分辨率，可采用酸性或碱性缓冲体系[10]。对于碱性蛋白质，可采用酸性缓冲体系的阴极电泳[10]。理想的缓冲系统 pH 可以通过蛋白质的滴定曲线（详见第 9 章）来选择。现在通常使用的缓冲系统有 Tris-甘氨酸（pH8.3～9.5）、Tris-硼酸（pH8.3～9.3）和 Tris-醋酸（pH7.2～8.5）[11]。

基于聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白质的原理，Williams 和 Reisfeld[12]提出了选择阳极电泳缓冲系统的考虑原则：

（1）*分离胶缓冲系统的选择* 电泳时分离胶缓冲系统的实际 pH 要比配制时高约 0.5，所以应考虑样品在电泳时，在此 pH 的溶解度和稳定性。且所有样品组分在此 pH 应带同性电荷。

（2）*先导离子（leading ion）的选择* 此离子应具有很高的迁移率，与样品分子有同性电荷，对样品组分没有破坏作用。氯离子常用作先导离子。

（3）*尾随离子的选择（tailing ion）* 一般应选择 p*K*a 值比分离胶缓冲系统高一个 pH 值的弱酸或氨基酸作为尾随离子。这样可以确保在电泳时有 50％的弱酸分子荷电，因而它们的迁移率高于任何样品组分。分离胶和浓缩胶应有相同的尾随离子。

（4）*浓缩胶缓冲系统的选择* 浓缩胶的 pH 应比尾随离子的 p*K*a 值低 2～3 个 pH。在这样的 pH 中，只有 0.1％～1％的弱酸分子荷电，且只有很低的导电性，以使其迁移率低于任何样品组分。

（5）*反向离子（counter ion）的选择* 应选用 p*K*a 值比分离胶低一个 pH 值的弱碱，以使分离胶缓冲系统有较高的缓冲能力。但它在浓缩胶中只有很小的缓冲能力，所以要注意不要有任何污染物改变了凝胶的 pH 值。

（6）*电极缓冲液的选择* 可使用与反向离子 p*K*a 值相同 pH 值的缓冲系统作为电极缓冲液，这样可以避免由于电解产物引起的 pH 变化。

酸性 pH 时，阴极电泳缓冲系统的考虑原则[12]：

1）实际电泳时分离胶缓冲系统的 pH 值比配制时低 0.5 个 pH，使样品组分均为正离子形式。

2）K^+为常用的先导离子。

3）尾随离子的 p*K*a 值应比分离胶缓冲系统不低于一个 pH，但比浓缩胶缓冲系统高 2～3 个 pH。

4）反向离子应选用 p*K*a 比分离胶缓冲系统高一个 pH。

Jovin[13]和 Everaerts[14]分别在 1973 年、1976 年将各种缓冲系统编入计算机程序，称“Jovin 输出”。它详尽地描述了在各种 pH 状态下泳动界面的物化性质，罗列 4000 多种能建立泳动界面缓冲系统的主要性质，可应用于 pH2.5～11.0 的范围。

缓冲系统的选择必须既能保持电泳分离后蛋白质的活性，又能使样品组分得到充分的分离。现在尚缺乏常规聚丙烯酰胺凝胶电泳通用的缓冲系统，但有三种不连续系统可选用。高 pH 系统（pH9.5[3,4,10]，pH8.9[10]）、"中性" pH 系统（pH8.0[12]）和低 pH 系统（pH5.5[10]、pH4.8[10]、pH3.6[15]）。

4.1.3.2 离子强度的选择

由于各种蛋白质对缓冲系统的离子强度、离子种类和所需辅助因子极其敏感，所以选择合适的常规聚丙烯酰胺凝胶电泳缓冲系统的离子强度是十分重要的。一般来说，低离子强度比较适合。因为此时导电性低，产生的热较少。同时可使被分离的带电颗粒对电流的贡献最大，从而加快电泳速度。但也不可过低，它必须可以缓冲被分离样品中带电颗粒对凝胶 pH 的影响，且过低的离子强度易导致蛋白质的凝聚。一般来说离子强度应在 0.01～0.1mol/L[11]，最常用的为 0.05mol/L[16]。

实际上在常规聚丙烯酰胺凝胶电泳中有多种缓冲系统需要考虑[10]，如样品缓冲液、凝胶缓冲液（包括浓缩胶缓冲液和分离胶缓冲液）以及电极缓冲液（包括阳极缓冲液和阴极缓冲液）。在连续缓冲电泳系统，即 pH 恒定的区带电泳中，不但凝胶孔径相同，且样品、凝胶和电极缓冲液均使用相同的缓冲系统，只是离子强度不同。而在不连续缓冲系统中，不但有两种不同孔径的凝胶（大孔径的浓缩胶和相对较小孔径但均一的分离胶或孔径不同的梯度分离胶），而且有一种或两种不同 pH 的缓冲液和三种不同的离子：①先导离子，如常用的氯离子和钾离子，它们具有较大的迁移率；②尾随离子，和先导离子有相同的电荷，但迁移率较小，常用弱酸和氨基酸作尾随离子；③反向离子，它和前二者离子带有相反的电荷。先导离子只存在于样品和凝胶缓冲液中，尾随离子在电极缓冲液中，反向离子则在凝胶缓冲液和电极缓冲液中均有，所以样品缓冲液和凝胶缓冲液可采用相同的系统，只是离子强度不同，前者常为后者的十分之一。

连续电泳和不连续电泳用的缓冲系统分别见表 4.1 和表 4.2。

表 4.1　连续电泳用的缓冲系统[17]

pH 范围	缓冲液组成	用以下酸或碱调节
2.4～6.0	0.1 mol/L 柠檬酸	1 mol/L 氢氧化钠
2.8～3.8	0.05 mol/L 甲酸	1 mol/L 氢氧化钠
4.0～5.5	0.05 mol/L 醋酸	1 mol/L 氢氧化钠或 Tris
5.2～7.0	0.05 mol/L 马来酸	1 mol/L 氢氧化钠或 Tris
6.0～8.0	0.05 mol/L 磷酸二氢钾（或钠）	1 mol/L 氢氧化钠
7.0～8.5	0.05 mol/L 二乙基巴比酸钠	1 mol/L 盐酸
7.2～9.0	0.05 mol/L Tris	1 mol/L 盐酸或甘氨酸
8.5～10.0	0.015 mol/L 硼酸钠	1 mol/L 盐酸或氢氧化钠
9.0～10.5	0.05 mol/L 甘氨酸	1 mol/L 氢氧化钠
9.0～11.0	0.025 mol/L 碳酸氢钠	1 mol/L 氢氧化钠

表 4.2　不连续电泳用的多相缓冲系统[18]

电泳时		每升缓冲液的组成		
浓缩胶 pH	分离胶 pH	浓缩胶	分离胶	电极液
8.3	9.5	32ml 1mol/L 磷酸 +7.13g Tris (pH 6.9)	60ml 1mol/L 盐酸 +45.75g Tris (pH 8.9)	2.88g 甘氨酸 +0.6g Tris (pH 8.3)
7.0	8.0	48.75ml 1mol/L 磷酸+6.19g Tris (pH 5.5)	60ml 1mol/L 盐酸 +8.56g Tris (pH 7.5)	5.52g 二乙基巴比妥酸+1.0g Tris (pH 7.0)
5.0	3.8	60ml 1mol/L 氢氧化钾+3.59ml 醋酸 (pH 6.7)	60ml 1mol/L 氢氧化钾+21.5ml 醋酸 (pH 4.3)	3.12g β-丙氨酸 +0.8ml 醋酸 (pH 4.5)
4.0	2.3	60ml 1mol/L 氢氧化钾+3.7ml 醋酸 (pH 5.9)	15ml 1mol/L 氢氧化钾+66.6ml 醋酸 (pH 2.9)	2.8g 甘氨酸 +0.3ml 醋酸 (pH 4.0)

4.1.4　凝胶浓度的选择

由于聚丙烯酰胺凝胶电泳分离不仅取决于蛋白质的电荷密度，而且取决于分子的大小和形状，因此凝胶的分子筛效应即凝胶的孔径与电泳的分辨率、电泳的速度以至实验的成败密切相关。按照凝胶孔径与被研究分子的大小和形状的关系，可以把凝胶分为非排阻性凝胶（unrestrictive gel）和排阻性凝胶（restrictive gel）两类。前者如0.7%～1.0%的琼脂糖凝胶，各种免疫电泳和低分子质量小肽分离用的聚丙烯酰胺凝胶电泳，后者如大于1%的琼脂糖凝胶（蛋白质或核酸电泳用）和常规聚丙烯酰胺凝胶电泳用的凝胶等。

在聚丙烯酰胺凝胶电泳中，影响分离结果的主要因素除了上节所述的缓冲系统的 pH 和离子强度外，凝胶浓度也是非常重要的。如果凝胶浓度太大，孔径小于样品分子的尺寸，电泳时蛋白质分子不能进入凝胶。电泳后样品仍留在加样位置。如果凝胶浓度太小，孔径太大，则样品中各种蛋白质分子均随着缓冲液流向前推进而不能得以很好地分离。再加上电泳时由弹性的凝胶链所组成的凝胶网络还会受到迁移蛋白质分子的挤压或变形，所以在非电泳时测得的凝胶孔径值并非与电泳时的实际孔径值相同。且样品的性质各不相同，欲寻找一个普遍规律是十分困难的，需要根据经验和摸索实验条件来确定最佳凝胶浓度。对于未知样品，通常可选用孔径较大的7.5%的均匀胶来试验，然后根据电泳区带的迁移距离再来寻找合适的浓度。如果样品为复杂组分的混合物，则应选择一定浓度范围的梯度凝胶。另外也可用 Ferguson 作图法[19,20]（以 $\lg R_f$ 对 $T\%$ 作图），即以几种浓

度的凝胶进行聚丙烯酰胺凝胶电泳，测定蛋白质在每一凝胶浓度的 R_f 值（参见4.1.6节）。理想的 R_f 值范围在0.25～0.85之间。根据凝胶浓度与分子质量的关系来选择凝胶浓度最为方便，但参考资料的数据各不相同，作者综合这些数据列出表4.3，仅作参考。

表4.3　凝胶浓度与分子质量测定的关系[11,21]

凝胶浓度 T（C=2.6%）	分子质量范围（kDa）	凝胶浓度 T（C=5%）	分子质量范围（kDa）
5	30～200	5	60～700
10	15～100	10	22～280
15	10～50	15	10～200
20	2～15	20	5～150

4.1.4.1　浓缩胶与分离胶

浓缩胶（concentrating gel）又称堆积胶（stacking gel）。凝胶浓度较小，孔径相对较大。把较稀的样品加在浓缩胶上，经过大孔径凝胶的迁移作用而被浓缩至一个狭窄的区带，使样品组分在分离胶中得以高分辨率的分离。

分离胶（seperation gel，resolving gel）又称电泳胶（running gel）。通常孔径较小，通过选择合适的凝胶浓度，使样品组分得以很好地分离。分离胶又可分为均一胶和梯度胶。

浓缩胶与分离胶常使用相同的缓冲系统，但不同的孔径和不同的pH和离子强度。如前者用pH6.7的Tris-HCl，后者用pH8.9的Tris-HCl。前者凝胶浓度常用4%，后者则根据被分离样品的分子质量大小而定。

4.1.4.2　浓缩胶的作用原理[22]

不连续缓冲系统的主要优点之一是可以使用稀样品。这是因为在样品进入分离胶以前，先经过大孔径浓缩胶的迁移作用而被浓缩至一极窄的区带。其作用原理是在缓冲系统中的弱酸，如甘氨酸，在接近其 pKa 的pH值时，任何时候都只有一部分分子带负电。若 X 是全部分子中被解离的部分，并以负离子形式存在，则每一分子可以看作是在全部时间中的 X 时间内带电，其余时间则不带电。若带电分子的泳动率为 M，则有效泳动率为 $M \cdot X$。电压梯度为 V，则泳动速度为 $V \cdot M \cdot X$。若两离子的 $V \cdot M \cdot X$ 相等，则泳动率较低的离子的泳动速度可以和泳动率较高的离子一样快。如样品和浓缩胶均用pH6.7的Tris-HCl缓冲液，电极液用Tris-甘氨酸缓冲液。此时，甘氨酸很少解离，其有效泳动率很低，而氯离子却有很高的泳动率，蛋白质分子的泳动率介于氯离子和甘氨酸之间。一旦

加上电压，作为先导离子的氯离子和作为尾随离子的甘氨酸离子分离开来，并在其后面留下一个导电性较低的区带。由于导电性与电场强度成反比，这一区带便获得较高的电压梯度，并加速甘氨酸的泳动，使其赶上氯离子，建立起甘氨酸和氯离子的电压梯度和泳动率乘积的相等的稳定态，使这些带电颗粒以相同速度泳动，两种离子之间具有明显的边界。当甘氨酸、氯离子界面通过样品进入浓缩胶时，在移动界面前有一低电压梯度，在界面后有一高电压梯度。由于在移动界面前的蛋白质泳动速度比氯离子低，因此氯离子能迅速越过。移动界面后的蛋白质处于较高的电压梯度中，其泳动速度比甘氨酸快。因此，移动的界面将蛋白质分子堆积到一起，浓缩为一狭窄的区带。蛋白质在移动界面中的浓缩作用仅取决于样品和浓缩胶中的 Tris-HCl 的浓度，而与样品中蛋白质的最初浓度无关。由于浓缩胶为大孔凝胶，故对样品没有分子筛作用。

当移动的界面到达浓缩胶和分离胶的界面时，凝胶的 pH 值明显增加，并导致甘氨酸的大量解离。此时甘氨酸的有效泳动率增加，使它越过蛋白质并直接在氯离子后移动。同时由于凝胶孔径变小，使蛋白质分子的迁移率减小。于是蛋白质分子在均一的电压梯度和 pH 值中泳动，并根据其固有的带电性和分子大小进行分离。

4.1.4.3 均一胶和梯度胶

均一胶（homogeneous gel）是指整块凝胶为同一浓度或者分离胶为均一浓度。均一胶虽然不能给出高分辨率，但灌胶简便，适合于简单组分的样品分离。

梯度胶（gradient gel）是指分离胶部分由一定的浓度梯度组成，可以是线性梯度，也可以是指数梯度。通常从阴极到阳极，浓度梯度逐渐增大，孔径变小（阴极电泳相反），利用分子筛作用提高分辨率。梯度胶适合于复杂样品的分离。

4.1.5 连续电泳和不连续电泳

1959 年 Raymond 和 Weintraub[1]首先使用聚丙烯酰胺作为电泳的支持介质进行蛋白质的分离是用连续电泳系统完成的。连续电泳（continuous electrophoresis）是指电泳系统使用相同孔径的凝胶和相同缓冲系统的样品缓冲液，凝胶缓冲液和电极缓冲液，且 pH 值恒定，只是离子强度不同的区带电泳，见图 4.3。使用这种电泳系统分离蛋白质，由于分子筛效应不明显，一般只用于分离组分比较简单的样品，且没有堆积胶的浓缩作用，分辨率较低，加样时必须加成一条极窄的带，以使样品能很好地分离。就像运动员应在相同的起跑线，以便公平竞争一样。如果高分辨不是实验目的，用这种方法制胶快而简单。它的另一个优点是在均一系统的电泳中，缓冲系统的精细组成是已知的，且 pH 是恒定的，这对分离 pH 敏感的化合物是有帮助的。可以防止蛋白样品进入凝胶后，由于 pH 变化而

发生凝聚和沉淀。另外它不需要像不连续缓冲系统一样去计算不同离子之间的迁移率变化，所以任何一种不同的酸和碱都能使用。

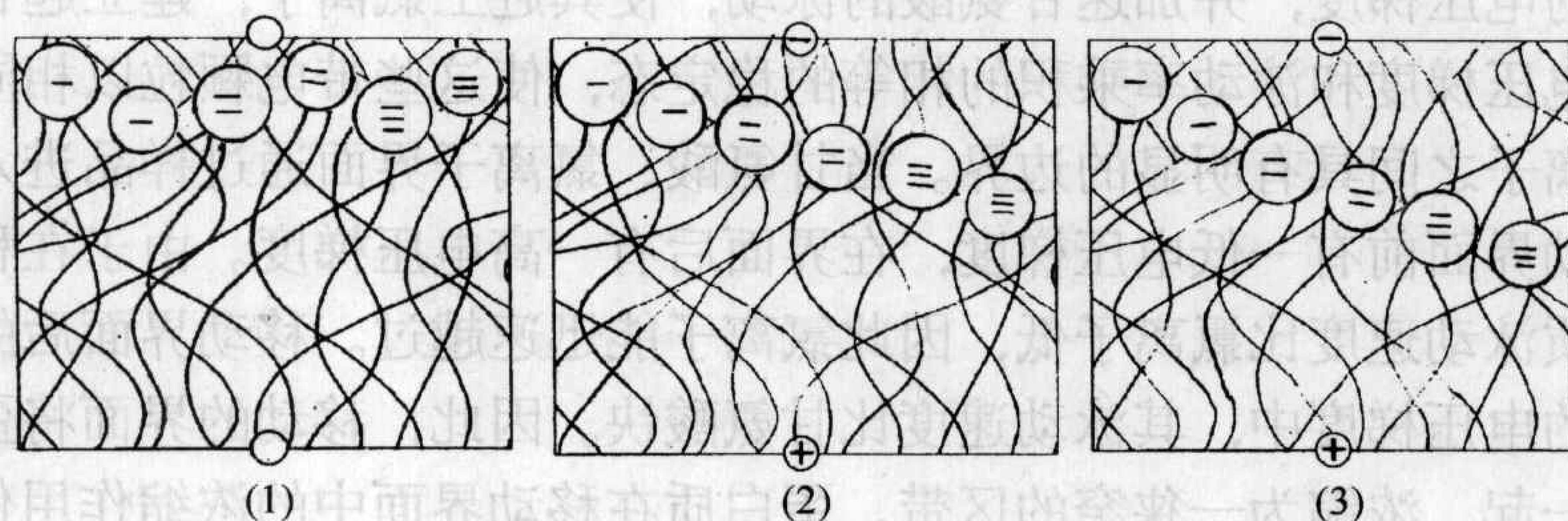


图 4.3　连续电泳

(1) 加样；(2) 加电场，开始分离；(3) 电泳结束

1963 和 1964 年 Hjertén[2]、Ornstein[2]和 Davis[3]首先使用不连续缓冲系统使电泳分离技术得到更快地发展。不连续电泳（discontinuous electrophoresis）是指使用不同孔径和不同缓冲系统的电泳。由于浓缩胶的堆积作用，可使样品（即使是稀样品）在浓缩胶和分离胶的界面上先浓缩成一窄带，然后在一定浓度（或一定浓度梯度）的凝胶上进行分离。由于不同孔径凝胶的分子筛作用，使不连续电泳的分辨率大大高于连续电泳。虽然不连续电泳在缓冲系统的选择和制胶（特别是梯度胶）的操作方面比较繁杂，但它可以得到电泳分离最重要的指标——高分辨，因而是目前应用最广泛的技术。不连续电泳的分离原理见图 4.4 和图 4.5。

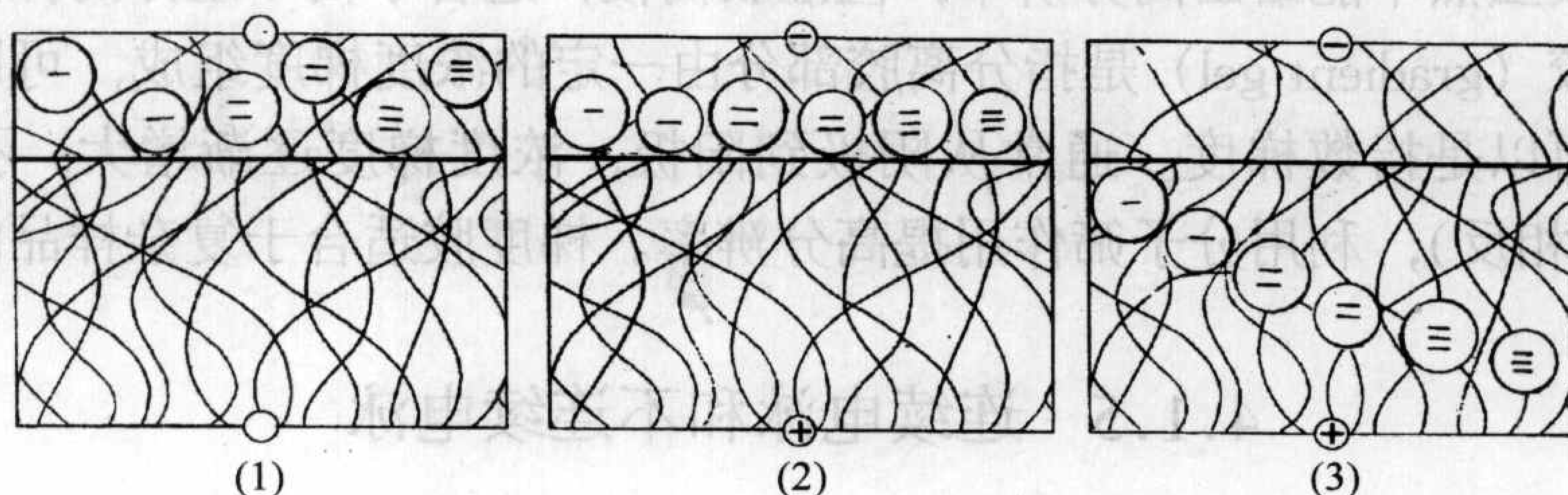


图 4.4　不连续电泳（分离胶为均匀胶）

(1) 加样；(2) 加电场，样品浓缩在界面上；(3) 电泳结束

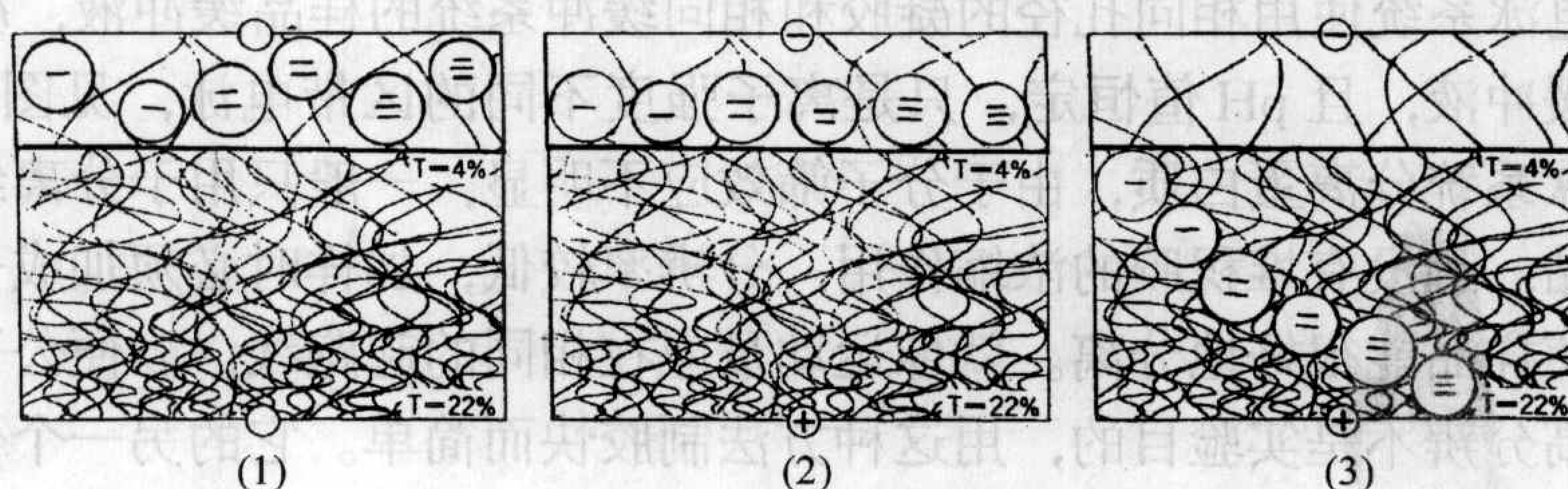


图 4.5　不连续电泳（分离胶为梯度胶）

(1) 加样；(2) 加电场，样品浓缩在界面上；(3) 电泳结束

4.1.6 分子质量测定

如上所述，聚丙烯酰胺凝胶电泳是根据蛋白质分子的电荷、形状和大小来分离的。而且在大部分情况下，这三个因素都在起作用。如果能排除电荷的影响，便可以根据蛋白质分子在聚丙烯酰胺凝胶中的迁移率和分子质量的相互关系来得到校正曲线。有两种方法可以排除电荷的影响：一种是用带有相当大量电荷的基团（如 SDS）结合到蛋白质分子上（详见第 5 章）以克服蛋白质分子原有电荷的影响而得到恒定的荷/质比。第二种方法，也就是常规聚丙烯酰胺凝胶电泳所用的方法——数学方法，即测量蛋白质分子在不同浓度凝胶中的相对迁移率来排除电荷因素的影响，这就是 Ferguson 作图法，见图 4.6。

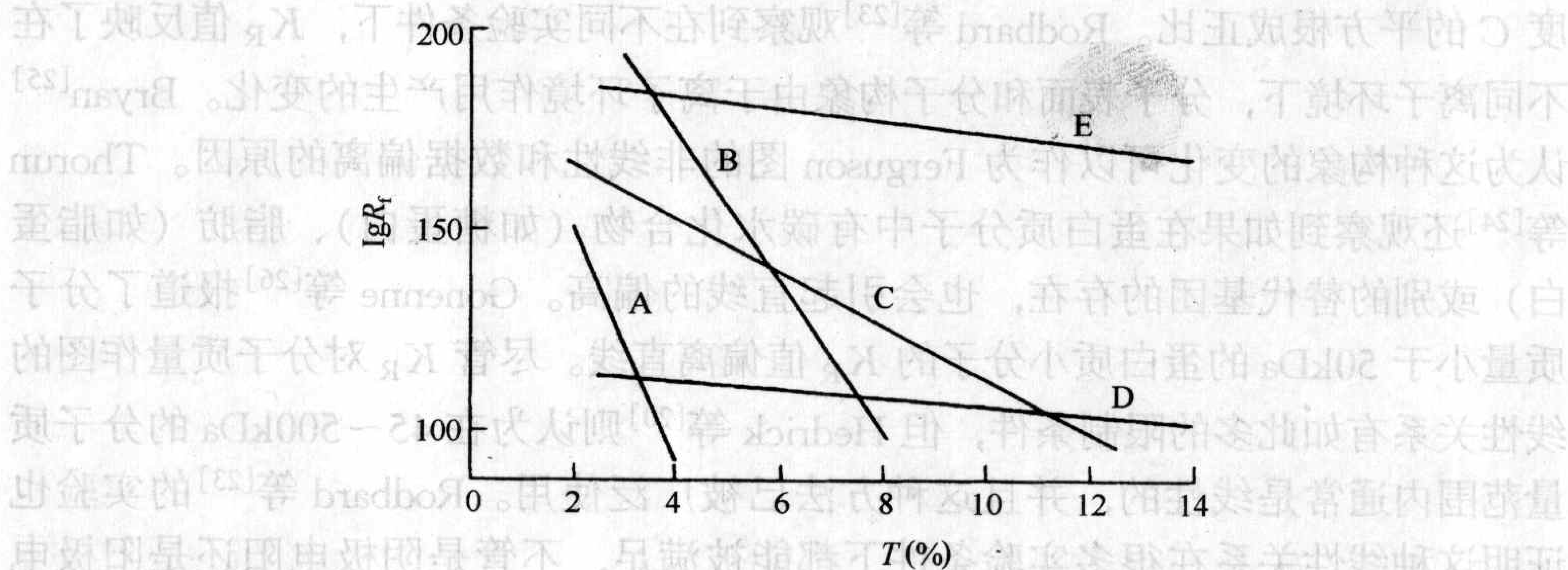


图 4.6 Ferguson 图

直线的斜率为阻滞系数 K_R，它和分子质量成正比。A 是大分子，在 $T>4\%$ 时，由于分子筛的作用，而不能迁移，B 也是大分子，但比 A 有较高的静电荷。C 是中等尺寸分子的典型直线。D 和 E 是小分子，只受到很小的排阻作用。D 只有很少的静电荷，故迁移率低。E 有很高的静电荷，所以在所有浓度范围的凝胶中都有很高的迁移率

1964 年 Ferguson[19] 首先在淀粉凝胶中证明了蛋白质分子的迁移率 m（mobility）的对数或相对迁移率 R_f（relative mobility）的对数对凝胶浓度 $T\%$ 作图，可以得到一条直线。这个现象接着在 1968 年由 Hedrick 和 Smith[20] 在聚丙烯酰胺凝胶中证实：

$$\lg m = \lg m_0 - K_R T$$

$$\lg R_f = \lg Y_0 - K_R T$$

这里 m 和 R_f 是在聚丙烯酰胺浓度为 T 时的迁移率和相对迁移率。m_0 和 Y_0 是假设当凝胶浓度 T 为 0%时的自由迁移率和自由相对迁移率。直线的斜率为阻滞系数 K_R（retardation coefficient）。它和凝胶系统的交联度、分子的形状和分子质量有关。

为了计算未知蛋白质的分子质量，必须用不同浓度的凝胶同时测量未知和已知分子质量的蛋白质的相对迁移率，作出 Ferguson 图。从图中直线的斜率得到已知和未知蛋白质分子的 K_R 值。用已知分子质量的蛋白质的 K_R 值对它们的分子质量作图，得到一条直线。再用未知蛋白质分子的 K_R 值从直线中查得它的分子质量。两个图的所有直线都应该用最小二乘方的回归线。Rodbard 等[23]建议至少用 7 种不同浓度的凝胶得到的值作图，以保证 K_R 和 Y_0 的精确度。用这种方法测定分子质量[24]，未知和已知蛋白质在迁移率和分子质量之间应该有相同的关系。K_R 值是随着实验条件，如聚合条件、pH、离子强度、温度和缓冲液组成等的改变而变化的。如有任何一种实验条件的改变，应该重新画 Ferguson 图，以得到该条件下的 K_R 值。

Thorun 等[24]观察到，在恒定凝胶浓度 T 时，相对迁移率 R_f 的对数和交联度 C 的平方根成正比。Rodbard 等[23]观察到在不同实验条件下，K_R 值反映了在不同离子环境下，分子表面和分子构象由于离子环境作用产生的变化。Bryan[25]认为这种构象的变化可以作为 Ferguson 图的非线性和数据偏离的原因。Thorun 等[24]还观察到如果在蛋白质分子中有碳水化合物（如糖蛋白）、脂肪（如脂蛋白）或别的替代基团的存在，也会引起直线的偏高。Gonenne 等[26]报道了分子质量小于 50kDa 的蛋白质小分子的 K_R 值偏离直线。尽管 K_R 对分子质量作图的线性关系有如此多的限制条件，但 Hedrick 等[20]则认为在 45～500kDa 的分子质量范围内通常是线性的，并且这种方法已被广泛使用。Rodbard 等[23]的实验也证明这种线性关系在很多实验条件下都能被满足，不管是阴极电阻还是阳极电泳。分子质量范围在 458～670kDa，pH3.6～10.2，离子强度在 0.0023～0.023mol/L，温度在 0～25℃，T 在 3%～30%，C 在 1%～5%之间都能满足线性关系。

Rodbard 等[23,27,28]的实验还证明，在 $\sqrt{K_R}$ 和分子半径 $\overline{R}$（stokes 半径）之间也可以得到线性关系。与简单的 Ferguson 作图法相比，用 $\sqrt{K_R}$ 对 $\overline{R}$ 作图的缺点是必须得到蛋白标准（即已知分子质量的蛋白）和未知蛋白的 $\overline{R}$ 值。虽然已经有计算机程序可用于得到这些数据，但大部分实验还是采用 Ferguson 作图法，而用 $\sqrt{K_R}$ 对 $\overline{R}$ 作图只适用于一些要求非常精确的工作，特别是球蛋白方面的工作。Bryan[25]和 Alder 等[29]在广泛的分子质量范围使用 K_R 对分子质量作图的结果，证明这个方法有比较大的实验误差。Bryan[25]在 60～900kDa 分子质量范围的蛋白质测定中，用 K_R 对分子质量作图，分子质量测定值的平均误差为 18%，个别值误差达到 32%。

由于球状蛋白在 K_R 和分子半径之间存在着线性关系，所以分子大小能以 Ferguson 图的直线斜率计算得到[20]。一旦自由迁移率和分子半径已经知道，则分子的净电荷也可以计算出来[20]。

在多组分化合物的聚丙烯酰胺凝胶电泳的分离中，由于分子的电荷密度、分子的尺寸和形状以及凝胶条件的不同，常有着互相交叉牵制的作用，所以分离情况比较复杂。如图 4.7（A），样品中的两个组分的分子具有相同的大小，不同的迁移率，Ferguson 图的直线表现为平行线。这说明乳酸脱氢酶 1（LDH_1）的电荷密度较大于乳酸脱氢酶 2（LDH_2）。如果有相同电荷密度，不同大小分子的两种蛋白质也可能表现为平行线。而图 4.7（B）中的铁蛋白和卵转铁蛋白的直线交叉，表明了它们电荷密度和分子大小的拮抗性，这是在常规聚丙烯酰胺凝胶电泳中最常见的现象。

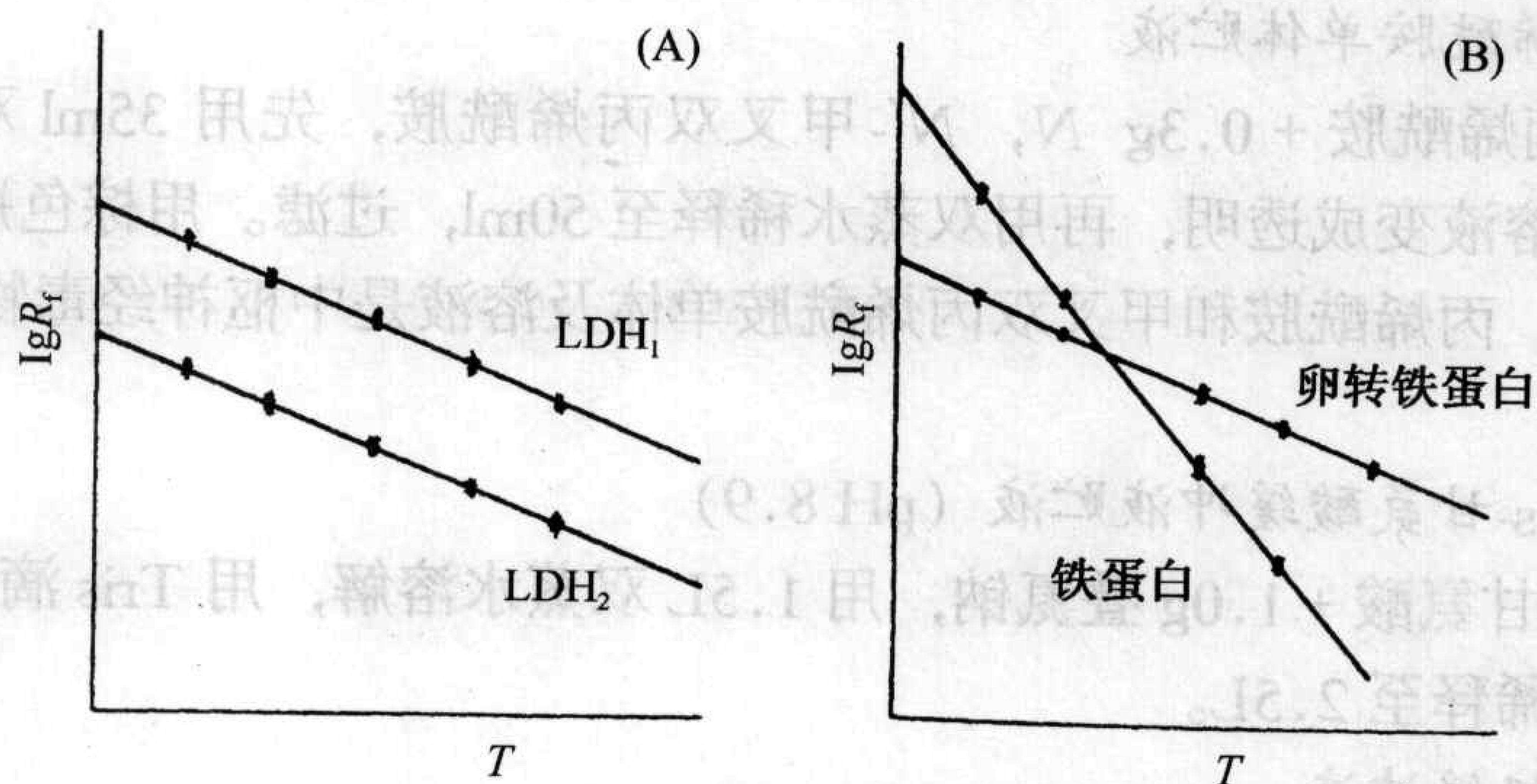


图 4.7　不同电荷密度和大小的分子的 Ferguson 图[30]

4.2　方　法

蛋白质分子在天然状态下的聚丙烯酰胺凝胶电泳是各种电泳的基础。用这种方法分离蛋白质虽然分辨率不高，但却可以保证蛋白质分子的构象和生物活性。根据被分离蛋白质的特性，可以分为通常使用的阳极电泳（anodal electrophoresis）和专为分离碱性蛋白的阴极电泳（cathodal electrophoresis）。根据分子大小和凝胶孔径的关系，可分为排阻性电泳和非排阻性电泳。根据缓冲系统的组成和凝胶孔径的变化，可分为连续电泳和不连续电泳。根据电泳的形式可分为圆盘电泳和平板电泳，后者又分为垂直平板电泳和水平平板电泳。正如第 3 章所述，由于半干技术的成熟，聚丙烯酰胺凝胶电泳现在已从圆盘电泳趋于水平平板电泳，特别是薄层水平平板电泳和水平平板电泳的自动化。

到目前为止，任何一种凝胶电泳的电泳方法都需要三个步骤：制胶和制样、电泳、检测，即电泳的三部曲。

4.2.1　制　胶

4.2.1.1　垂直平板电泳的制胶

用于垂直平板电泳的凝胶通常被灌注在两侧有隔片的两块玻璃板之间。模具

垂直放置，周围用硅油（或其他密封物质）密封，或用夹子夹紧，以免胶液泄漏。溶液从顶部灌注。灌胶完成后从顶部插入梳子，以形成加样孔。梳子宽度取决于玻璃板的宽度，梳子的厚度和凝胶的厚度取决于隔片的厚度。

在垂直电泳装置上可以进行连续电泳或不连续电泳。它们的差别之一在于制胶方法的不同。连续电泳仅有分离胶，并且整个电泳使用相同缓冲系统，所以灌胶是极为方便的。不连续电泳需要先灌注分离胶（均一胶或梯度胶），再灌注浓缩胶，需要掌握一定的技术。垂直电泳用的灌胶模具种类繁多，应根据说明书使用。表 4.4 为常用的连续电泳的凝胶配方[11]，贮液配置如下：

（1）丙烯酰胺单体贮液

11.1g 丙烯酰胺 + 0.3g *N*，*N'*- 甲叉双丙烯酰胺，先用 35ml 双蒸水溶解，搅拌，直到溶液变成透明，再用双蒸水稀释至 50ml，过滤。用棕色瓶，可在 4℃保存一个月。丙烯酰胺和甲叉双丙烯酰胺单体及溶液是中枢神经毒物，要小心操作。

（2）Tris-甘氨酸缓冲液贮液（pH 8.9）

30.04g 甘氨酸 + 1.0g 叠氮钠，用 1.5L 双蒸水溶解，用 Tris 滴定至 pH8.9，再用双蒸水稀释至 2.5L。

（3）电极缓冲液

1 份 Tris-甘氨酸缓冲液贮液 + 1 份双蒸水。

（4）样品缓冲液

1ml Tris-甘氨酸缓冲液贮液 + 0.1mg（或适量）溴酚蓝 + 19ml 双蒸水。

（5）10%过硫酸铵

0.1g 过硫酸铵 + 1.0ml 双蒸水。使用前新鲜配制。

表 4.4 连续电泳用凝胶配方[11]

贮液	凝胶终浓度		（C 均为 2.6%）
	$T=3.6\%$	$T=5.1\%$	$T=7.7\%$
单体贮液（ml）	3.15	5.3	6.7
缓冲液贮液（ml）	10.0	10.0	10.0
双蒸水（ml）	6.74	4.59	3.19
10%过硫酸铵（μl）	100	100	100
TEMED（μl）	10	10	10

注：①加过硫酸铵以前，溶液应抽气，过硫酸铵要在即将灌胶前加。

②过硫酸铵和 TEMED 的量，应根据室温和聚合情况而定。

③欲配制不同终浓度，不同厚度或不同大小的凝胶，可根据表中的体积按比例变化。

④凝胶聚合后，应在 4℃保存 12 小时再用，以使凝胶充分聚合，孔径均匀，以改善电泳分辨率。

⑤高浓度（7.5%、10%、15%、20%）凝胶的配方参见表 4.5。

由 Ornstein[3]和 Davis[4]首先发展的不连续电泳（当时用于圆盘电泳）是将浓缩胶（非排阻性大孔凝胶）加在分离胶上，并且使用不同缓冲系统。所以需要分别灌注分离胶和浓缩胶。表 4.5 为不连续电泳的凝胶配方[10]。贮液配置如下：

（1）丙烯酰胺单体贮液

14.55g 丙烯酰胺＋0.45g *N*，*N*′-甲叉双丙烯酰胺，先用 35ml 双蒸水溶解，搅拌，直到溶液变成透明，再用双蒸水稀释至 50ml，过滤。用棕色瓶可在 4℃保存一个月。丙烯酰胺和甲叉双丙烯酰胺单体及溶液是中枢神经毒物，要小心操作。

（2）浓缩胶缓冲液贮液（0.5mol/L Tris-HCl，pH 6.8）

3.03g Tris 溶解在 40ml 双蒸水中，用 4mol/L 盐酸调至 pH6.8。再用双蒸水稀至 50ml，保存在 4℃备用。

（3）分离胶缓冲液贮液（1.5mol/L Tris-HCl，pH8.9）

18.16g Tris 溶解在 80ml 双蒸水中，用 4mol/L 盐酸调至 pH8.9。再用双蒸水稀至 100ml，保存在 4℃备用。

（4）10%过硫酸铵

0.1g 过硫酸铵＋1.0ml 双蒸水。使用前新鲜配制。

（5）电极缓冲液

0.025mol/L Tris，0.2mol/L 甘氨酸，pH8.3。

15.14g Tris＋72.07g 甘氨酸，用双蒸水稀释到 5L。可在室温保存一个月。

（6）样品缓冲液（0.1mol/L Tris-HCl，pH6.8）

表 4.5　不连续电泳浓缩胶和分离胶的配方[10]

贮液	凝胶终浓度 *T*（*C*＝3%）				
	4%	7.5%	10%	15%	20%
单体贮液（ml）	0.65	3.8	5.0	7.5	10.0
浓缩胶缓冲液贮液（ml）	0.10	—	—	—	—
分离胶缓冲液贮液（ml）	—	0.3	0.3	0.3	0.3
双蒸水（ml）	4.25	10.9	9.7	7.2	4.7
10%过硫酸铵（μl）	5	15	15	15	15
TEMED（μl）	2.5	7	7	7	7

注：①在加过硫酸铵以前，溶液应抽气，过硫酸铵应在即将灌胶前加。

②过硫酸铵和 TEMED 的量应根据室温和聚合情况而定。

③欲配制不同终浓度，不同厚度或不同大小的凝胶，可根据表中的体积按比例变化。

④凝胶聚合后，应在 4℃保存 12 小时再用，以使凝胶充分聚合，孔径均匀，改善电泳的分辨率。

⑤表中 *T*＝7.5%、10%、15%、20%，（*C*＝3%）的分离胶可作为连续电泳用的分离胶。

2ml 浓缩胶缓冲液贮液+1ml 87%甘油+0.1mg 溴酚蓝，用双蒸水稀释至10ml，可在-20℃保存6个月。

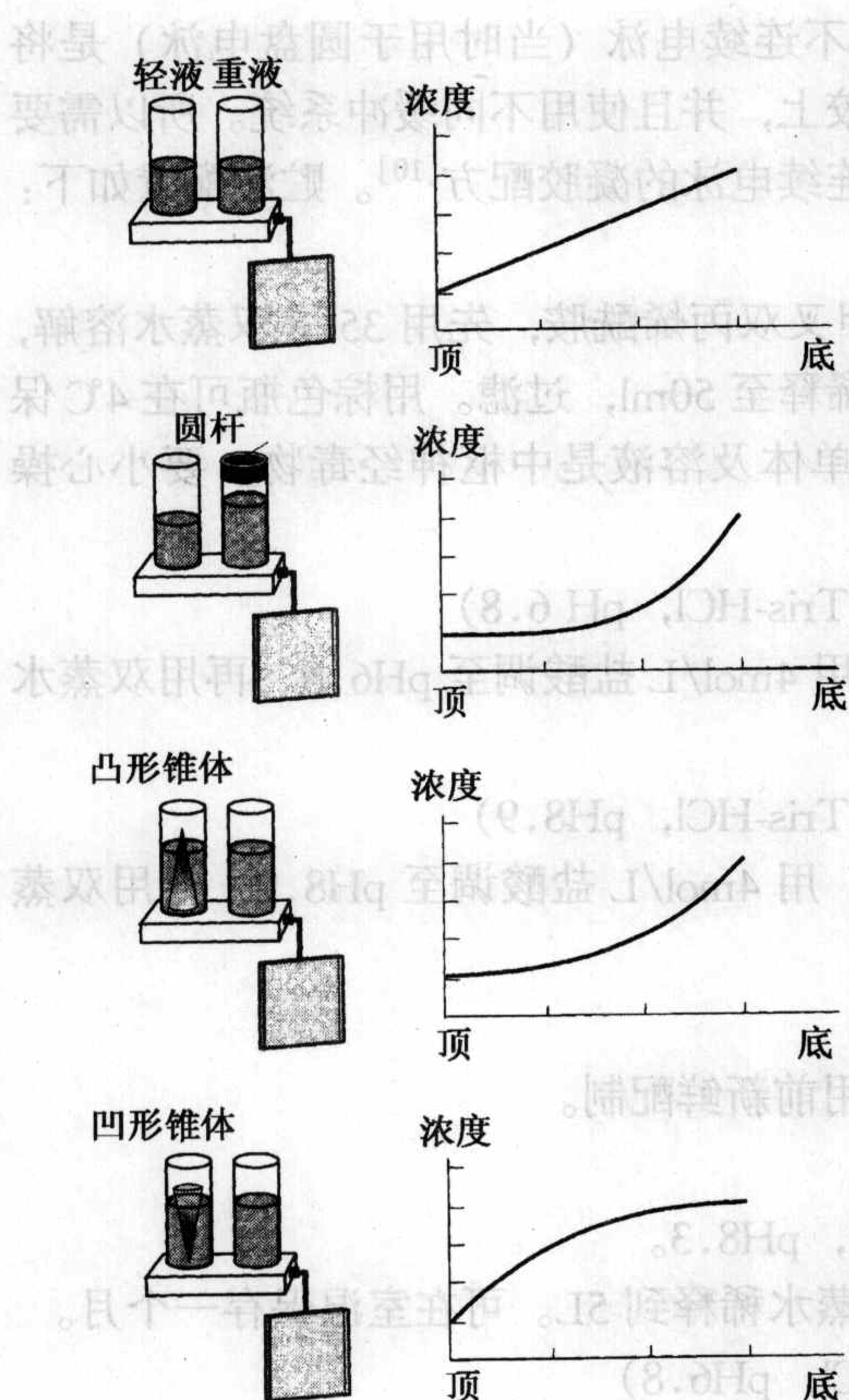


图4.8　灌注线性梯度和指数梯度凝胶的方法[21]

按配方在模具中灌注分离胶后，小心地在分离胶的表面加一层水（或水饱和的异丙醇或正丁醇），封住胶面，以促使聚合并使凝胶表面平直。凝胶在30～40℃放置约40分钟～1小时后，可以看到一个界面，表示凝胶聚合。吸掉水（或水饱和的异丙醇或正丁醇），用浓缩胶缓冲液贮液淋洗凝胶，然后灌注浓缩胶。并插入与模具大小相同，与凝胶厚度相当的梳子。为防止气泡陷入，梳子应倾斜插入。然后让模具再静止放置在30～40℃，聚合约40分钟～1小时。如果带着梳子过夜可能会影响分辨率，所以浓缩胶最好在使用前再灌注。

如灌注线性梯度胶，则在灌注分离胶时需要用梯度混合器，有时还需要蠕动泵。梯度混合器分贮液腔（盛轻液）和混合腔（盛重液）。两腔间有腔间阀。后者与出口相连接。混合液从混合腔中流出。改变两个腔的大小或溶液配方，就能改变梯度的斜率。在贮液腔中插入凸形锥体（convex）或凹形锥体（convave）就能形成指数梯度（指数梯度不常用），见图4.8。梯度混合器的使用方法参见4.2.1.2。

4.2.1.2　水平平板电泳的制胶

水平电泳与垂直电泳的制胶方法在连续电泳时相同，不连续电泳时的制胶方式都为垂直灌注，差别只在于：

1）垂直电泳用的凝胶在顶端用梳子形成加样孔，而水平电泳可在凝胶聚合后在胶面上加样或在凝胶上做加样孔。
2）垂直电泳必须先灌注分离胶，后灌注浓缩胶，以便插入梳子；水平电泳用的凝胶是平铺在冷却板上电泳的，所以可以先灌注浓缩胶，后灌注分离胶。且浓缩胶中加有甘油，所以不需等待聚合，便可接着灌注分离胶，使操作大为简便。而且由于浓缩胶中的甘油使加样孔中保有一定的水，所以对样品的高

盐浓度不敏感，有时可以免去透析。

3）垂直电泳是先灌注分离胶，所以底部的梯度胶浓度最大；而水平电泳是后灌注分离胶，所以顶部的凝胶浓度最大。这样在聚合时不会有热对流的干扰。并且这种灌注法不会在小孔径凝胶中有高浓度的甘油，可以避免在电泳时由于甘油吸湿而引起小孔的泡胀。

4）垂直电泳制胶后，不需取胶，仍将胶置于玻璃板中电泳；但水平电泳需要将聚合后的凝胶从灌胶模具中取出，平铺于冷却板上进行电泳，因此电泳时冷却效果较好。

5）目前水平电泳用的凝胶厚度大多薄于垂直电泳。薄胶从分辨率，电泳时间，灵敏度，保存方便，实验材料的节省等方面都显然优于厚胶，是当前发展的方向。

水平方式的连续电泳用的凝胶配方和贮液配置同垂直电泳，请参见表 4.4。不连续电泳用的凝胶贮液同垂直电泳，配方见表 4.6[10]。

表 4.6　不连续电泳浓缩胶和分离胶的配方[1]

贮液	凝胶终浓度 T（$C=3\%$）				
	4%	7.5%	10%	15%	20%
单体贮液（ml）	0.65	3.8	5.0	7.5	10.0
浓缩胶缓冲液贮液（ml）	0.10	—	—	—	—
分离胶缓冲液贮液（ml）	—	0.3	0.3	0.3	0.3
87%甘油（ml）	1.0	0.3	0.3	0.3	0.3
双蒸水（ml）	3.25	10.6	9.4	6.9	4.4
10%过硫酸铵（μl）	5	15	15	15	15
TEMED（μl）	2.5	7	7	7	7

注：①在加过硫酸铵以前，溶液应抽气，过硫酸铵要在即将灌胶前加。

②过硫酸铵和 TEMED 应在灌胶前加，它们的量应根据室温和聚合情况而定。

③欲配置不同终浓度，不同厚度或不同大小的凝胶，可根据表中的体积按比例变化。

④凝胶聚合后，在 4℃保存 12 小时后再使用，以使凝胶充分聚合，孔径均匀，改善电泳时的分辨率。

如果要在凝胶上做加样孔，需要准备一块可重复使用的小孔成型模板。模板通常是用不附着胶的玻璃板制作的。先用去污剂清洗玻璃板，然后用蒸馏水淋洗。用滤纸吸干，再用无水乙醇淋洗玻璃表面以去掉任何残留的不纯物。把玻璃板放在坐标纸上，贴几层隔片带在玻璃表面上，见图 4.9。用一把锐利的刀去掉多余的隔片带。在小孔成型条之间切成 2～3mm 的小段。所加层的数目和条的宽度取决于样品体积。小孔成型条的长条取决于计划的加样数。例如，加 5ml 样品，小孔成型条应该是两层厚，2mm 宽和 7mm 长。小孔成型条制成的孔可加多至 100μl 的样品。

隔片带可以用 DYMO 带（一种不干胶带）制作小孔成型条。如果凝胶厚为

1mm，应在玻璃模板上贴两层。如果凝胶厚为 0.5mm，应贴一层。为了保持电流通过小孔，凝胶层应覆盖在小孔底部最小厚度 0.2mm。

小孔应做在浓缩胶和分离胶界面的浓缩胶一侧，使小孔和阴极之间为均一的浓缩胶。见图 4.9 和图 4.10。

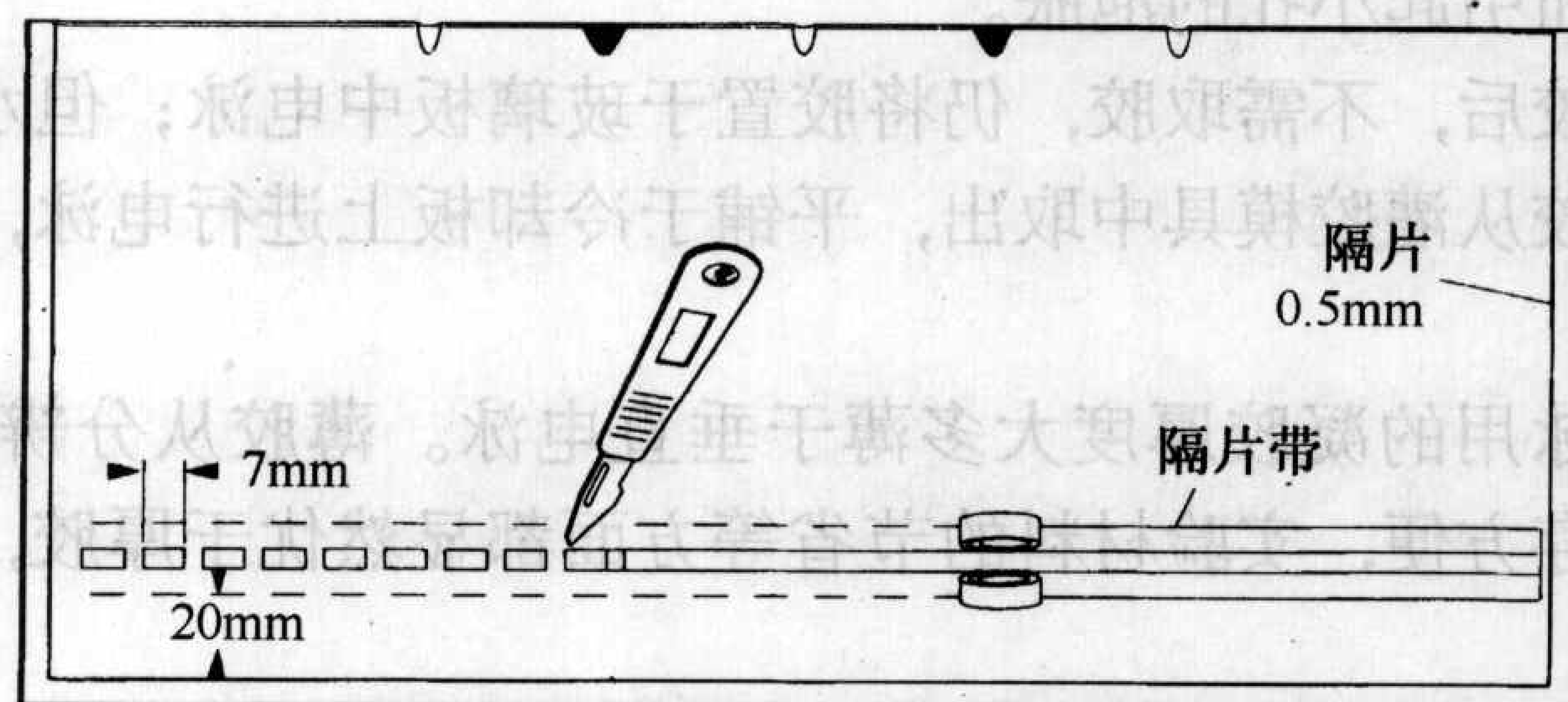


图 4.9 在玻璃板上准备成型小孔[31]

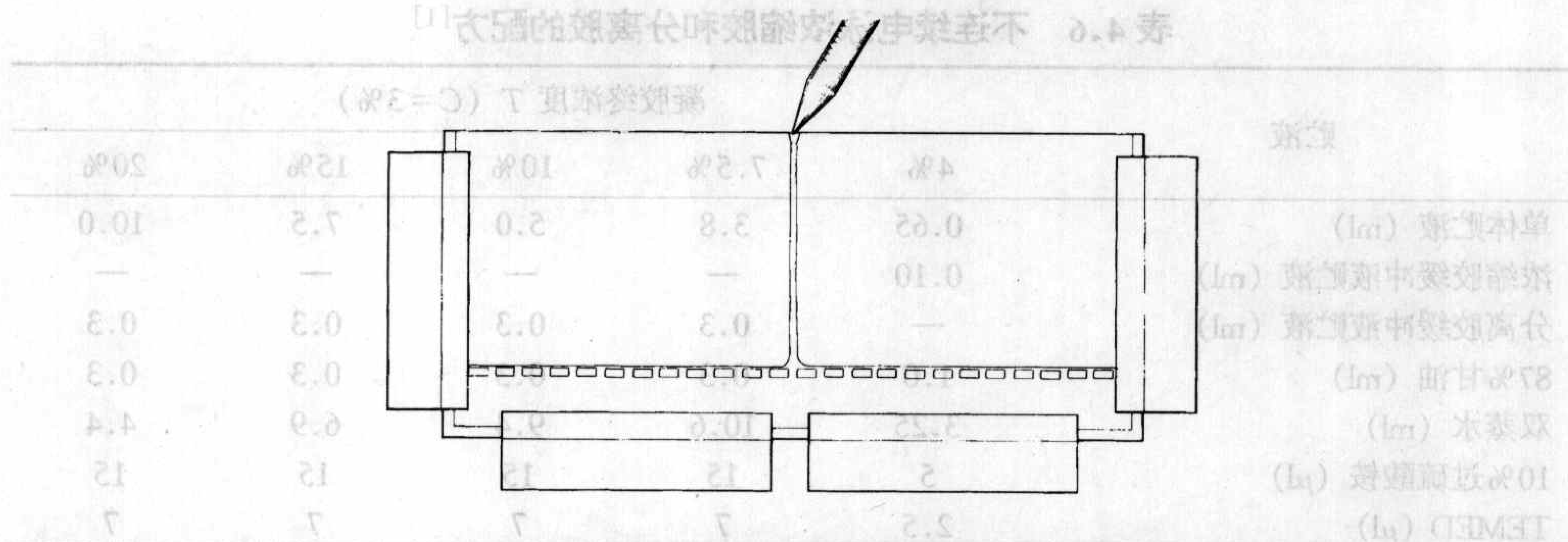


图 4.10 灌注浓缩胶后，接着灌分离胶[31]

组装模具前先将玻璃板洗净，在不黏胶的玻璃板上涂一层不黏胶的硅烷。把黏胶的支持膜铺在另一块玻璃板上，用滚筒赶去气泡和多余的水，用夹子夹好模具（见图 4.11）。为防止凝胶在灌注时聚合，应预先将模具放在 4℃ 冰箱中预冷。灌注线性梯度胶的贮液同不连续电泳，配方见表 4.7[31]。先将一定量的轻液注入梯度混合器的贮液腔，小心打开腔间阀，赶去腔间气泡，如有轻液流入混合腔，需吸回贮液腔，关上腔间阀。再将重液注入混合腔，并加入搅拌子。梯度混合器应置于已调水平的磁力搅拌器的合适位置上，两腔中的液面应该相平。每腔先各加入 TEMED，再加过硫酸铵。先打开腔间阀，再立即打开流出管的夹子，两腔中的液面应同时下降。梯度混合器与模具之间应有合适的高度差，使灌注在 1～5 分钟完成。灌注后在室温静止 15 分种，再放在 30～40℃ 烘箱中聚合。聚合约需 1 小时完成。聚合后在 4℃ 至少放置 12 小时使其充分聚合，孔径均匀后才可使用。梯度胶的灌注比较繁杂，但它可以分离复杂样品。由于分子筛的作用，

有较好的分辨率，且谱带细窄。

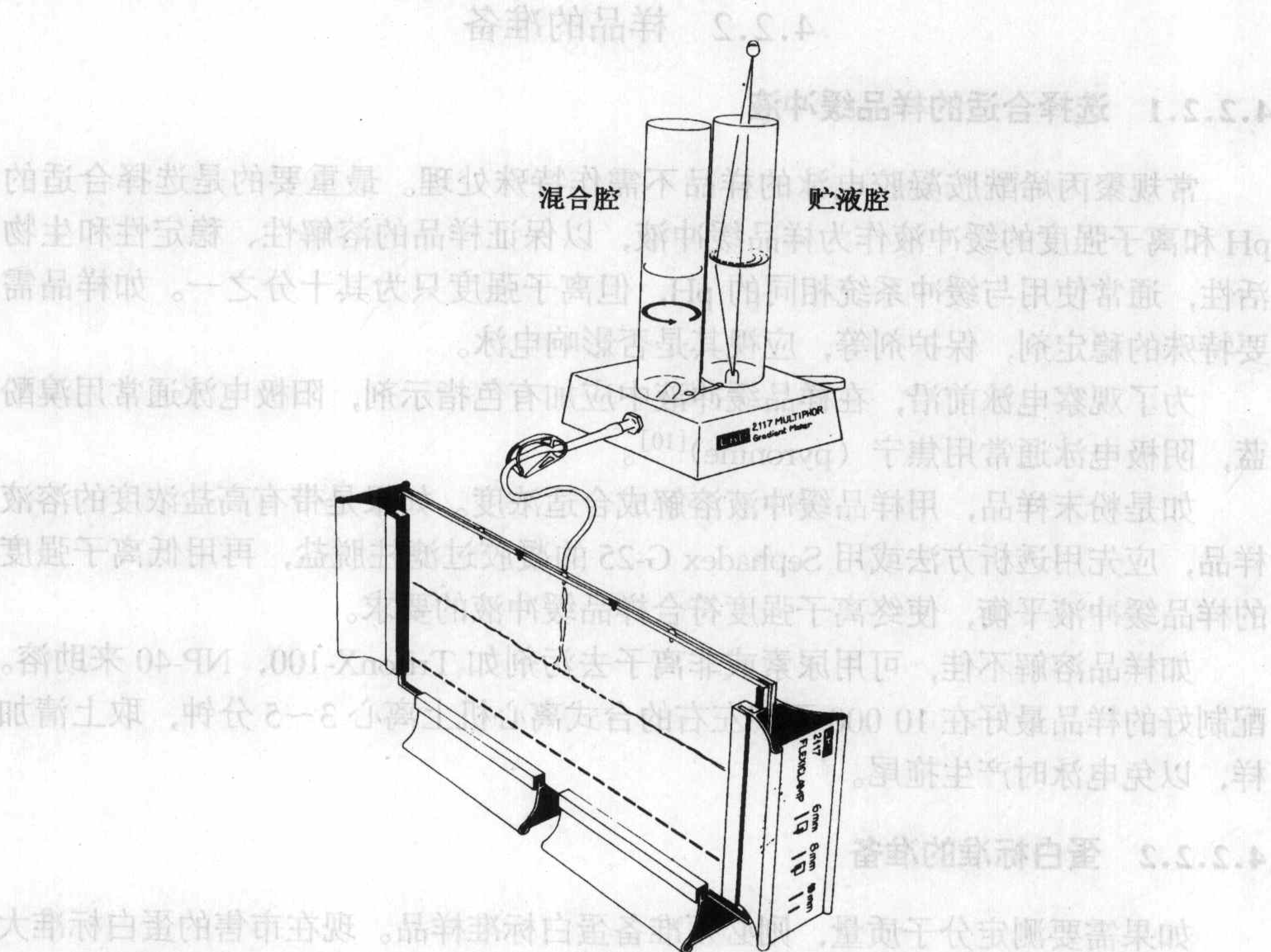


图 4.11　灌注浓缩胶后，接着灌梯度分离胶[31]

表 4.7　梯度胶的配方[31]

	浓缩胶 $C=3\%$	分离胶终浓度 T（$C=3\%$）							
		4～22.5		4～10		10～22.5		8～18	
	$T=4\%$	D	L	D	L	D	L	D	L
单体贮液（ml）	0.65	1.3	7.5	1.3	3.3	3.3	7.5	2.7	6
浓缩胶缓冲液贮液（ml）	1.25	—	—	—	—	—	—	—	—
分离胶缓冲液贮液（ml）	—	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
87%甘油（ml）	1.4	2.8	—	2.8	—	2.8	—	2.8	—
双蒸水（ml）	1.7	3.4	—	3.4	4.2	1.4	—	2.0	1.5
10%过硫酸铵（μl）	18.0	36.0	27.0	36.0	27.0	36.0	27.0	36.0	27.0
TEMED（μl）	2.5	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0

注：①D 代表重液，加在混合腔中。L 代表轻液，加在贮液腔中。

②为了防止凝胶在灌注时聚合，可预先将模具放在 4℃预冷。

③在加过硫酸铵以前，溶液应抽气。过硫酸铵应在灌胶前加。

④过硫酸铵和 TEMED 的量应根据室温而改变。

⑤欲配制不同终浓度，不同厚度或不同大小的凝胶，可按表中的体积按比例变化，等体积混合重液和轻液。

⑥凝胶聚合后，应在4℃保存12小时再使用，以使凝胶充分聚合，孔径均匀，改善电泳时的分辨率。

4.2.2 样品的准备

4.2.2.1 选择合适的样品缓冲液

常规聚丙烯酰胺凝胶电泳的样品不需作特殊处理。最重要的是选择合适的pH和离子强度的缓冲液作为样品缓冲液，以保证样品的溶解性、稳定性和生物活性，通常使用与缓冲系统相同的pH，但离子强度只为其十分之一。如样品需要特殊的稳定剂，保护剂等，应视其是否影响电泳。

为了观察电泳前沿，在样品缓冲液中应加有色指示剂，阳极电泳通常用溴酚蓝，阴极电泳通常用焦宁（pyronine）[10]。

如是粉末样品，用样品缓冲液溶解成合适浓度。如果是带有高盐浓度的溶液样品，应先用透析方法或用 Sephadex G-25 的凝胶过滤柱脱盐，再用低离子强度的样品缓冲液平衡，使终离子强度符合样品缓冲液的要求。

如样品溶解不佳，可用尿素或非离子去污剂如 TritonX-100，NP-40 来助溶。配制好的样品最好在 10 000 万转左右的台式离心机上离心 3～5 分钟，取上清加样，以免电泳时产生拖尾。

4.2.2.2 蛋白标准的准备

如果需要测定分子质量，则必须准备蛋白标准样品。现在市售的蛋白标准大多是由一系列纯化的，不同分子质量的蛋白质组成，它们之间不会发生相互作用，且有良好的线性关系。如安玛西亚公司的蛋白标准，分子质量范围为66 000～669 000Da，由 5 种蛋白组成，见表 4.8。

表 4.8 蛋白标准（66 000－669 000）*

蛋白	分子质量（Da）	来源	含量（μg）
甲状腺球蛋白	669 000	猪甲状腺	76
铁蛋白	440 000	马脾	50
过氧化氢酶	232 000	牛肝	36
乳酸脱氢酶	140 000	牛心	48
白蛋白	66 000	牛血清	40

* 本表摘自 Amersham Bio-sciences 公司 2004 年目录 p.404

蛋白标准也可自已配制，选择 5～7 种合适分子质量范围的蛋白溶解在样品缓冲液中，分装后，在－20℃保存。注意不要错用 SDS 蛋白标准。

4.2.2.3 样品浓度

样品的浓度取决于样品的组成，分析目的和检测方法。对未知样品可作一个

0.1～20mg/ml蛋白的稀释系列，以寻找最佳加样浓度。如用考马斯亮蓝染色，可用浓度为1～2mg/ml的样品。如果样品组分复杂，如细胞匀浆液，为了观察痕量成分，主带便会过量。对高纯度样品，0.5～2mg/ml蛋白为最佳。银染色所用的样品浓度可比考马斯亮蓝染色低20～100倍。用同工酶染色，免疫固定染色视方法不同而异。电泳后欲进行转移，应有足够的样品量。

4.2.2.4 加样要求

如进行垂直电泳，加样前轻轻将梳子倾斜拔出，防止气泡陷入。用电极缓冲液淋洗加样孔，吸出，再加适量电极缓冲液。然后用微量注射器小心将样品加成一细窄带（特别是连续电泳），否则将影响电泳分辨率。如果没有足够数目的样品，应在加样孔中加样品缓冲液，不要留有空孔，以防止电泳时邻近带的扩展。

如进行水平电泳，可以在胶面上直接加样，或用滤纸块加样，或在加样孔中加样。在凝胶面上直接加样时不可超过3μl。加样间距大于1 cm才可加5μl。对连续电泳，一定要加成一条细窄带，否则会影响分辨率。对不连续电泳，由于浓缩胶的作用，在进入分离胶以前会浓缩成细窄带。阳极电泳的样品加在阴极侧，阴极电泳的样品加在阳极侧。

4.2.3 电　　泳

4.2.3.1 垂直电泳

如果进行垂直电泳，按说明书先在电泳槽的下槽中装入电极缓冲液。将聚合后的凝胶连同玻璃板一起放入电泳槽中，在上槽中注入电极缓冲液，打开冷却循环系统，连接电源。一般起始电压约为70～80V，然后不断升高。起始电流可设置为20～30mA，取决于凝胶的厚度，大小和样品数。在电泳过程中，应记录电参数的变化，以便以后重复。一般垂直电泳需要2～6小时，取决于凝胶孔径，特别是缓冲系统和电参数的选择。

待溴酚蓝前沿到达电泳槽底部（阳极）时，切断电源，关掉冷却循环系统。取出凝胶，准备染色。

4.2.3.2 水平电泳

目前有三种方式进行水平电泳。一是搭接滤纸桥，这是最经典的方式。二是使用半干技术，即用凝胶条或滤纸块的方法，参见第3章图3.2。经典方法的操作比较麻烦，电泳时间一般需要2～4小时。使用半干技术，操作简便，电泳时间只需0.5～1小时左右，并且不影响分辨率。本节介绍经典的搭滤纸桥的方法，在4.3.6节实验考虑中介绍最新的半干技术。

1）先将电极缓冲液加在电泳槽两侧的缓冲液槽中，打开冷却循环系统，调节温

度在 4～12℃。视室温而定。室温低时，设置较低的温度。反之，室温高时或样品中有尿素时，设置较高的温度。

2）在冷却板上铺一层煤油或液体石蜡（冬天因液体石蜡太黏稠，不宜使用），再铺凝胶，并赶出其间的气泡。使凝胶和冷却板有很好的接触，以排除电泳过程中在凝胶上产生的热。

3）用电极缓冲液浸泡 8～10 层滤纸电极芯，并确保滤纸之间没有气泡。将泡好的电极芯与凝胶搭接，至少重叠 1cm。为了在凝胶上两电极之间得到均匀的电压梯度，使电泳区带平直，两侧电极芯与凝胶搭接的边缘必须严格平行。电极芯的另一端悬在电极缓冲液中，见图 4.12。

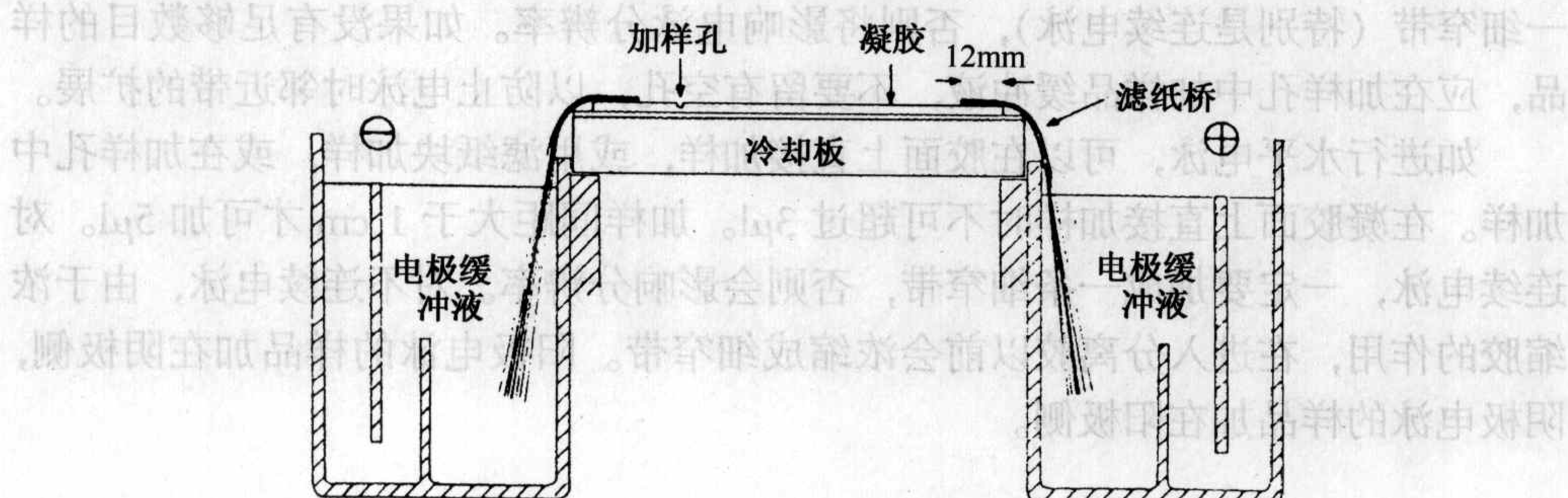


图 4.12　使用滤纸桥的水平电泳

4）打开电源，开始预电泳，以去除凝胶中的不纯物质。预电泳时间一般为 20 分钟，时间过长会产生电解产物。

5）加样可直接滴加在凝胶表面（不多于 3μl），或滴加在加样孔中，或加在合适孔径的滤纸块上。加样后，进行 5～10 分钟的低电压，低电流电泳（原电压和电流的 1/5 到 1/2），以使蛋白质分子顺利地进入凝胶。

6）电泳时按说明书选择合适的电压，电流和功率参数，阳极电泳时，待溴酚蓝前沿接近阳极（阴极电泳时，待指示剂前沿接近阴极）后，关掉电源，停止电泳，准备染色。

4.2.4　检　　测

常规聚丙烯酰胺凝胶电泳后的检测，对于不同的目的，应采用不同的检测方法。由于这种电泳方法不破坏蛋白质的生物活性，所以可选用的检测方法很多。

4.2.4.1　早期染色方法

用染料和生物大分子结合形成有色的复合物是电泳后检测最常用的方法。选

用染料通常应考虑以下要求：

1）必须与大分子结合以形成一个不溶性的，有色的，紧密的复合物，但不结合到凝胶中和支持膜上，以便从凝胶中除去，否则高背景会影响蛋白带的辨别和定量扫描。

2）染料必须容易溶解在对大分子没有影响的溶剂中，以利于背景的脱色。

3）选用高吸光系数的染料有利于提高定量测定的灵敏度。

4）选用能与大分子有专一性结合的染料，并在结合后能产生不同的颜色（如荧光），可以提高检测的选择性和灵敏度。

早期用于蛋白染色最常用的染料是氨基黑 10B（amido black 10B)、萘黑 12B 200（naphthalene black 12B 200)、萘酚蓝黑 6B（naphthol 6B)、水牛黑（buffalo black)、滂酰蓝黑 SC 或 SX（pontacyl blue black SC or SX)。氨基黑是一种含有两个 SO_3H 基团的酸性重氮化合物，所以能被结合到蛋白质的阳离子基团上。

用 7%醋酸或 5:5:1 体积比的水:甲醇:冰醋酸的混合溶剂配制 1%氨基黑溶液，过滤后备用。将凝胶在染液中浸泡 2～6 小时，然后用上述溶液脱去背景。如欲加速染色，可以加温。由于水、甲醇、醋酸混合溶剂的轻度水化作用，凝胶有时会收缩，所以需要根据凝胶的浓度，大小和形状来控制染色和脱色的时间。

使用氨基黑染色会对以后的定量测定带来一些问题。这是因为：

1）定量测定受不同厂家和批号的染料的影响[32]；

2）不同的蛋白结合不同量的染料[33]，可以呈现不同的颜色，如蓝黑色或棕色[34]，所以每个组分需要自己的标准曲线；

3）染色的不均一性和高背景使得用氨基黑染色得到的扫描面积不仅决定于蛋白量，而且决定于迁移距离以及区带周围的背景[35,36]。Racusen[37]根据他的实验数据，1mol/L 的碱性氨基酸结合 0.56±0.6mol/L 的氨基黑，建议将电泳后的凝胶浸在 0.01%氨基黑（在 7%醋酸中）中至少 16 小时，并加热，搅拌。

4.2.4.2　考马斯亮蓝染色

在蛋白染色方法中，目前以考马斯亮蓝染色最为常用。因为它既克服了氨基黑染色灵敏度不高和进行定量扫描的限制，又比 4.2.4.3 节将介绍的银染色方法简便。

考马斯亮蓝染色首先是由 Fazekas 等[38]在 1963 年用于醋酸纤维素膜电泳，并认为同样可用于纸电泳，琼脂电泳和淀粉凝胶电泳。1965 年 Meyer 等[39]将此方法用于聚丙烯酰胺凝胶电泳。检测灵敏度约为 0.2～0.5μg[40]。

考马斯亮蓝 R-250（coomassie brilliant blue R-250）即三苯基甲烷（triphenylmethane)。每个分子含有两个 SO_3H 基团，偏酸性，与氨基黑一样也是结合在蛋白质的碱性基团上。在一定 pH 时，这种染料-蛋白复合物被完全解聚[38]。考马

斯亮蓝 R-250 与不同蛋白结合呈现基本相同的颜色，并且在比较宽的范围内（15～20μg），扫描峰的面积与蛋白量有线性关系。对一些蛋白，如α-尿素酶，线性范围甚至为 1～55μg[41]。考马斯亮蓝又分为 R-150、R-250、R-350、G-250 等。其中 R-350 最为灵敏，R 为红蓝色，G 为蓝绿色。考马斯亮蓝 G-250 即二甲花青亮蓝（Xylene Cyanine Brilliant Blue G250），是一种甲基取代的三苯基甲烷。考马斯亮蓝 R-250 和 G-250 的结构式如图 4.13。不同的配方，不同的染色方法适合于不同性质的蛋白，有关考马斯亮蓝的染色方法见 Righetti[42]的综述。



图 4.13　考马斯亮蓝

（1）考马斯亮蓝 R250；（2）考马斯亮蓝 G250

考马斯亮蓝有两种染色方法：一种是先固定，再进行染色和脱色。第二种是同时进行固定和染色，再脱色。固定液、染色液、脱色液的配法很多，方法也很多。表 4.9 列示三种方法供参考[43,44]，表中方法一和方法三固定较好，方法二则比较简便快捷，且在系统中不使用甲醇。固定和染色的时间，特别是后者，取决于凝胶的厚度、孔径及有否支持膜。固定的时间可以长一些。染色时间不宜过长，否则增加脱色的困难。Fishbein[34]的实验证明，染色时间超过 12 小时，染色强度不会增加。为了加速染色和脱色过程，可加温和搅拌染色液和脱色液。在染色后，脱色前用脱色液浸湿的棉花球轻轻擦洗凝胶表面，除去染料颗粒，可使脱色的凝胶清晰明亮。这是常用的扩散脱色法。如果有条件也可以用电泳脱色法。因为考马斯亮蓝是偏酸性染料，可将染色后的凝胶放在有孔的塑料片之间，系统中充以 7%醋酸。水平电极置于两侧，并与一个大电流的电源相连接。这样脱色便可在 15～30 分钟内完成。

Sreeramulu 等[45]报道用 0.5mol/L 氯化钠的水溶液（浓度范围 0.1～2mol/L）作为脱色液，只需 2～3 小时就可看到紫蓝色的蛋白带。

由于常规聚丙烯酰胺凝胶电泳的系统中没有 SDS，所以染料贮液可以重复使用。如果贮液中出现颗粒，可以过滤除去。只是重复使用的染液不能控制浓度，不利于定量测定。用过的脱色液可以用活性炭吸附过柱，以节省溶剂。

表 4.9　考马斯亮蓝 R-250 染色方法

	方法一[43]	方法二[44]	方法三[43]
固定	将 57g 三氯醋酸和 17g 磺基水杨酸加在 150ml 甲醇和 350ml 蒸馏水中，搅拌至溶解	500ml 乙醇 + 100ml 冰醋酸 + 400ml 蒸馏水	20%三氯醋酸
	固定半小时	至少固定半小时	固定半小时
染色	将 1.25g 考马斯亮蓝 R-250 溶在 230ml 甲醇和 230ml 蒸馏水中，搅拌 1 小时后加 40ml 冰醋酸，过滤	0.29g 考马斯亮蓝 R-250 溶在 250ml 下述脱色液中	同方法一或方法二
	先用下述脱色液漂洗凝胶，再染色约 1 小时	将染色液加热至 60℃染色 10 分钟	
脱色	500ml 冰醋酸 + 1500ml 95% 乙醇，再用蒸馏水加至 500ml	250ml 95% 乙醇 + 80ml 冰醋酸，再用蒸馏水加至 1000ml	同方法一或方法二
	多次更换脱色液，直至背景脱净为止	多次更换并加热脱色液，直至背景脱净为止	

对碱性蛋白和低分子质量多肽的检测，Steck 等[46]认为最好使用甲醛固定。因为甲醛能交联蛋白和聚丙烯酰胺凝胶，使蛋白不会在染色时丢失。

考马斯亮蓝染色的第二种方法是同时进行固定和染色。考马斯亮蓝 G-250 常用这种方法。这种方法的特点是快而简便，有时甚至不需脱色。灵敏度略逊于 R-250。Blakesley 等[47]报道整个染色过程只用 30 分钟，可检测大于 1μg 的蛋白。Vesterberg[48]介绍了三种 G-250 染色方法，检测灵敏度可优于 0.2μg，最快染色过程也只需 1 小时。在这类方法中，常将考马斯亮蓝溶于三氯醋酸[48~50]或过氯酸[51]中，在这两种溶剂中，考马斯亮蓝是很难溶解的，结果形成的主要是染料和蛋白质的复合物，所以染色很快。在 Reisner[51]的实验中可以看到染料在稀过氯酸溶液中和结合到蛋白上时呈现的颜色变化，且富含赖氨酸的组蛋白由于可溶解于过氯酸不能被检测，但能选择性地检测到富含精氨酸的组蛋白。表 4.10 列示三种方法[48~52]供参考使用。

考马斯亮蓝 G-250 对小肽染色备受青睐。常用的方法[53~55]是将 2g 考马斯亮蓝 G-250 溶解在 1L 蒸馏水中，再加 1L 1mol/L 硫酸。搅拌 3 小时后过滤，此时溶液为棕色。再加 220ml 10mol/L 氢氧化钠。最后，再加 310ml 100%三氯醋酸，此时溶液为蓝绿色，备用。将凝胶在 50℃，浸染 3 小时或在室温过夜，就可见到蓝绿色的蛋白带。再用蒸馏水漂洗凝胶约 1 小时，蛋白带更为清晰。使用

此方法能将10～15个氨基酸的寡肽进行固定和染色。作者曾用此方法检测大米中的醇溶蛋白[56]和低分子质量的蝎毒蛋白[10]，结果是非常理想的。

表4.10 考马斯亮蓝G-250染色方法[48～52]

	方法一	方法二	方法三
固定	30g三氯醋酸+9g磺基水杨酸于186ml水中 在60℃固定半小时	—	—
固定和染色	在100mg考马斯亮蓝G-250+200ml水中慢慢加入7.5ml 70%（v/v）的过氯酸，再用水加至250ml，搅拌1小时小孔滤纸过滤 在60℃染色30分	0.04%考马斯亮蓝G-250溶于3.5%过氯酸+20%的甲醇溶液中 固定和染色到见带为止约1～2小时	0.04%考马斯亮蓝G-250溶于3.5%过氯酸中，室温搅拌1小时，滤纸过滤，再用0.45μm的Millipore过滤作贮液，使用前，贮液:水为3:5作染液 固定和染色90分钟在37℃染色速率提高2倍*
脱色		5%醋酸+20%甲醇	

*染色后，将凝胶浸在5%醋酸中，检测灵敏度可提高三倍。

4.2.4.3 银染色

1979年Switzer和Merril等[57,58]首先在“Analytical Biochemistry”上介绍了比考马斯亮蓝染色灵敏2个数量级的银染色方法，它可以检测小至0.38ng/mm^{2}的牛血清白蛋白。这个方法接着在1980年由Oakley等[59]进一步发展以达到简化程序和低消耗的目的。有关这个方法的研究很多，可参见Dunn[60]和Merril[61]的综述。Ohsawa等[62]报道了一种改进的银染方法，可检测小至10^{-15}g（femtograms，飞克）的蛋白。由于银染的灵敏度高，各大公司均生产银染试剂盒。

银染的机制是将蛋白带上的硝酸银（银离子）还原成金属银，以使银颗粒沉积在蛋白带上。用银染蛋白的吸光度对它们的浓度作图呈现不同的斜率，表明染色的程度是与蛋白中的一些特殊基团有关。研究还表明碱性和含硫氨基酸在银染中的重要性[63]，所以不含或只含很少胱氨酸残基的蛋白质有时是呈负染。目前对银染的详细机制还不是非常清楚。

在银染过程中，蛋白质首先需要被固定。固定有两个作用，第一是把蛋白固定在凝胶中或至少是阻滞它们在凝胶中的扩散。第二是为了去除干扰染色过程的物质，如去污剂、还原试剂和缓冲液的成分（如甘氨酸）。常用的固定剂有戊二醛[62]、乙醇、甲醇、醋酸[64,65]以及三氯醋酸[66]，然后将凝胶放在银染溶液中

显色。

目前的银染方法可以分为两大类，化学显色（chemical development）和光显色（photodeve lopment）。化学显色方法又进一步分为双胺银染法（diamine silver stains）和非双胺化学显色银染法（non-diamine chemical development silver stains）。双胺银染色是用氢氧化铵形成银-双胺复合物。将固定后的凝胶浸泡在这个溶液中，并通过酸化（通常用柠檬酸）使其显像，现在被广泛使用。Oakley[59]和 Wray[67]的方法即属于这一种。

非双胺化学显色银染法是将固定的凝胶放在酸性的硝酸银中，在硝酸银和蛋白质发生作用后，在碱性 pH，用甲醛还原离子化的银成金属银来达到显像的目的。Sammons 等[64]报道的这种方法比 Oakley 等[59]和 Morrissey[65]的方法灵敏 10 倍，通常用酸化（柠檬酸或醋酸）停止显色。用碳酸钠处理凝胶可以进一步增强染色的强度[64, 65]。

光显色方法是使用光能还原银离子成金属银。因为光能够在酸性 pH 还原银，所以一旦凝胶被固定，光显色方法染色能使用单一染色溶液，而不像化学染色程序那样通常至少需要两种溶液。

大部分蛋白使用银染时显示棕色或黑色，但是有一些银染方法会产生各种颜色，而且以此可以辨别不同的蛋白。例如 Goldman 等[68]发现一些脂蛋白呈现蓝色，一些糖蛋白呈现黄、红或棕色。银颗粒由小变大时，颜色可由红/黄通过蓝变成黑。带电氨基酸侧链的变化也是银染颜色变化的关键。此外，银颗粒在凝胶中的分布也会影响显色，所以在电泳带中的蛋白量也是影响因子。

表 4.11 所示为 Wray[67]等双胺银染方法，适合于复杂蛋白质混合物。但在大部分情况下采用多色银染[64, 69]，见表 4.12。因为它能提供更多的信息以辨别不同的蛋白。而且由于颜色对比，有时能检测到最小量的蛋白。用这种银染方法有五种基本的色调，黑、蓝、棕、红或黄。这个方法的最大优点是比单色银染更加灵敏。

表 4.11　双胺银染方法[67]

1. 将凝胶浸泡在 50% 甲醇中，至少 1 小时。
2. 配制溶液 A：0.8g 硝酸银溶在 4ml 去离子水中。溶液 B：混合 21ml，0.36% 氢氧化钠和 1.4ml 新鲜配制的 14.8mol/L 氢氧化铵。
3. 边搅拌，边滴几滴溶液 A 到溶液 B 中，用去离子水加到 100ml。此溶液必须在使用前配制，将凝胶在溶液中染色 15 分钟，最好在平台摇床上振摇。
4. 用去离子水漂洗 5 分钟，边洗边振摇。
5. 将凝胶放在显色液中，直到蛋白带出现。显色液是将 2.5ml 1% 柠檬酸与 0.25ml 37% 甲醛混合，用去离子水加至 500ml。显色液也必须在使用前配置。蛋白带在 10 分钟内显色。
6. 用去离子水漂洗凝胶后用 50% 甲醇终止进一步显色。

表4.12　多色银染方法[64,69]

1. 准备贮液：

   银染液：将1.9g硝酸银溶解在1L去离子水中。

   还原液：将30g氢氧化钠加在1L去离子水中，使用前再加7.5ml 37%甲醛。

   增色液：70.5g碳酸钠溶解在10L去离子水中。

2. 配制固定液（50%乙醇，5%醋酸）。将凝胶浸泡在固定液中，室温过夜。凝胶与固定液的体积为1:5.5。

3. 次日，用去离子水洗三次凝胶，每次1小时。

4. 将凝胶放在银染液中振摇1小时。凝胶与染液的体积比为1:3。

5. 用去离子水漂洗凝胶（约10～15秒）以除去凝胶表面的银。如果漂洗不彻底，在凝胶表面会出现黑色的银颗粒。

6. 如"1"中所述加甲醛到还原液中，并立即将凝胶放入此混合液中，在平台摇床上摇8～10分钟。凝胶与还原液的体积比为1:5.5。

7. 弃去还原液，将凝胶放在增色液中，振摇约1小时。凝胶与增色液的体积比也为1:5.5。

8. 更换增色液，再摇1小时。

9. 更换增色液，振摇过夜。背景为黄色。如果背景太黑，在加甲醛前，将凝胶在温和的还原液中放2～3分钟。

由于塑料容器可能有痕量的有机化合物干扰银染色，所以染色过程应采用玻璃容器。另外，水的纯化对银染是至关重要的，表4.10和表4.11的作者均采用去离子水，但作者在SDS凝胶的银染实验中证明需要再用玻璃蒸馏器蒸馏1～2次，背景染色会明显降低[44]。要注意试剂纯度，有聚合现象的甲醛、戊二醛不能使用[44]。凝胶最好先照相，再干燥保存。

银染方法还在不断改进，主要是提高灵敏度、缩短染色时间和简化操作。Berson[70]使用一个蓝色程序，灵敏度比单用化学显色方法增加3～7倍。Blum等[71]利用改进的银染方法可在ng范围内检测植物蛋白、RNA和DNA，而且无背景色。Granzier[72]解决了大分子（3MDa）的可溶性和银染色问题。Kirkeby[73]等最近提出了一种染色程序，只在乙醇-醋酸中预固定10分钟，再在甲醛和戊二醛溶液中固定5分钟，这样就大大缩短了染色过程的时间。Heukeshoven[74,75]和作者[44]在SDS电泳中所用的银染色全过程只需1.5～2小时，参见表5.8，实际上用于SDS电泳的银染色方法也适用于常规聚丙烯酰胺凝胶电泳，灵敏度可达1～5ng。但对SDS电泳，检测灵敏度可达0.3ng。最近，Swain等[76]提出一种新的染色程序，可以达到高分辨和无背景色的目的，这些程序将在第5章中介绍。

在酸性凝胶中进行组蛋白分离的银染方法可参见Rabilloud等[77]使用的程序。

如果用考马斯亮蓝染色不能检测到蛋白带，而背景十分清晰的情况下，可以再进行银染色。Krause[78]用考马斯亮蓝染色并干燥后的凝胶再进行快速的银染。

这个方法适用于等电聚焦，SDS 电泳等。见表 4.13。

表 4.13　干胶的 5 分钟快速银染[78]

1. 配制贮液：

溶液 A：25g 碳酸钠溶解在 500ml 双蒸水中。

溶液 B：1.0g 硝酸铵，1.0g 硝酸银，5.0g tungstosilisic acid，7ml 37% 甲醛，用双蒸水加到 500ml。

2. 使用前混合 35ml 溶液 A 和 65ml 溶液 B。将凝胶放在摇床上振摇，直到蛋白带显色，用蒸馏水淋洗。

3. 用 0.05mol/L 甘油终止。用棉花擦去凝胶表面和支持膜上的银颗粒。

注：如果银染前的凝胶未处理过，则将凝胶放在 20% 三氯醋酸中。用 45% 甲醇和 10% 醋酸混合液洗 2 次，每次 5 分钟。再用蒸馏水洗 4 次，每次 5 分钟。在 0.75% 甘油中浸泡 2 分钟，干燥。

4.2.4.4　其他染色方法

苯胺黑（aniline black）又称尼格洛辛（nig rosine），分子式为 $C_{38}H_{27}N_3$，在有些情况下也可用于蛋白染色。Lee[79] 用水溶性的苯胺黑对面筋蛋白（gluten protein）染色比用氨基黑染色更清晰。Coulson 等[80] 把它用于检测免疫沉淀反应后的小麦内胚乳蛋白的染色有特殊的优点。Aragancillo 等[81] 的实验认为在有些情况下，苯胺黑的染色灵敏度甚至优于氨基黑。

丽春红 S（Ponceau S）也可用于聚丙烯酰胺凝胶染色，灵敏度为 1～2μg。它有两种形式：猩红（jana scarlet）和酸红（acid red）。Cousden[82] 等认为应使用后一种比较合适。

快绿 FCF（Fast Green FCF）染色对聚丙烯酰胺凝胶电泳后的蛋白定量扫描特别有利[83]。将凝胶浸泡在 1% 的快绿 FCF 溶液（用 7% 醋酸配制）中约 2 小时。用 7% 醋酸脱色，其线性关系在 150～200μg 范围内。而在同样情况下使用氨基黑，其线性关系只在 1～3μg。快绿 FCF 通常用于组蛋白的染色[33]。Gilmore 等[84] 用氢氧化钠从染色的蛋白上洗脱快绿，缩短了定量测定的时间，并且不需使用有毒的有机溶剂。Allen 等[85] 和 Wilson[52] 也对快绿染色有过报道。

Dahlberg 等[86] 用 Stains-All（1-ethyl-2-｛3-［ethyl naphto（1, 2, d）-thiazolin-2-ylidine］-2-methyl-propenyl｝-naphtho（1, 2, d）-thiazolium bromide）进行蛋白染色，这是一种光敏染料，染色和脱色时要避免见光，蛋白带呈红色。

大家所熟知的蛋白与2, 4-二硝基氟苯（2, 4-dinitrofluorobenzene）的反应也能用于蛋白的检测[87]。将凝胶在暗处浸在 2.5% 的2, 4-二硝基氟苯中约 16 小时，再用盐酸脱色。用这个方法检测牛血清蛋白比氨基黑 10B 灵敏。用此方法还可以直接测定 N 端的氨基酸残基，因而可以得到蛋白质纯度的信息。

4.2.4.5 一些蛋白的染色方法

(1) 糖蛋白

糖蛋白可以通过蛋白或碳水化合物的染色来检测。上述的蛋白染色方法如氨基黑10B[88]，快绿FCF[89]，考马斯亮蓝R-250[90]都能用于电泳后检测糖蛋白，还有一些方法是基于与糖的部分反应。过去常用的方法是利用品红（fuchsin）的高碘酸-希夫氏试剂（periodic-Schiff's reagent）染色，简称PAS染色[91]。Mathieu等[92]改进了PAS染色方法，使染色强度在2小时内迅速增强，然后再在8小时缓慢增强，改进后的方法其灵敏度比原来高2倍。染色带在520nm扫描。不同的糖蛋白其峰的面积和含量的线性关系呈现不同的斜率。所以为了定量需要，要严格使用相应的标准曲线。Wardi等[93]和Eckhardt等[94]也改进了PAS方法。前者可检测至2～3μg的糖蛋白，后者则可检测到40ng的糖蛋白。Alcian蓝（alcian blue）染色能用于酸性糖蛋白的检测[95,96]。

外源凝集素和碳水化合物的专一相互作用是检测糖蛋白的一种温和的方法。这种方法[97～99]使用荧光素异硫氰酸盐（fluorescein isothiocyanate，FITC）标记外源凝集素。将凝胶在pH7.0左右在室温下浸12小时，用相同的缓冲液脱色。FITC溶液能被重复使用3次。在4℃，荧光蛋白带至少能在紫外灯下可见一个月。灵敏度约为100ng，取决于与外源凝集素结合的碳水化合物。FITC-外源凝集素可以从市场上买到，也可以自己制备。由于基础科学研究的需要和市场的兴趣，关于糖蛋白的结构与功能的研究正受到人们的关注。而荧光标记糖化物的电泳分析是一个高分辨和灵敏的方法，Jackson[112,113]对此进行了专门的论述。用荧光方法从糖基检测糖蛋白的方法参见4.2.4.7节。

使用丹磺酰肼（dansyl-hydrazine）的方法可以灵敏地检测低至40ng的碳水化合物[94]。另一种百里酚-硫酸（thymol-sulfuric acid）方法[100,101]也具有类似的灵敏度。用荧光标记[94,97～99,102]、放射性标记[103～107]或酶联反应[108～110]都可以得到理想的灵敏度。但在聚丙烯酰胺凝胶电泳中检测糖蛋白最灵敏的方法还是银染色。Dubray[111]用银染色得到的灵敏度比PAS法高60倍，最低检测量可低至0.4ng。

(2) 磷蛋白

Green等[114]用阳离子碳化青（cationic carbocyanine）作为磷蛋白的染料。这种染料可以在酸性介质中或有尿素存在时使用。染色后得到蓝色的带可用于扫描。

检测磷蛋白最灵敏的方法是使用放射性标记^{32}P。但在此同时，脂类和核酸也会被标记，所以在电泳前还必须先分离除去，这是一个繁琐的过程。

非放射性磷蛋白的测量方法是以释放磷酸盐的陷入（entrapment of liberated phosphate，ELP）最为常用[115]，它取决于在有氯化钙时，蛋白质磷酸酯键的碱

水解产生的不溶性磷酸钙陷入在凝胶中，然后用甲基绿染色。1nmol/L 的磷酸盐便能给出亮绿的蛋白带。Debruyne 改进的 ELP 方法是基于形成一个不溶性的罗丹明 β-磷钼酸盐（rhodamine β-phosphomolybdate），灵敏度能增加 2～3 倍[116]。虽然银染色方法更灵敏，但是一些非磷蛋白也可能同时被染色[117]。Dahlberg[86]和 Green[114]的 stains-all 方法可将磷蛋白染成蓝色，非共轭蛋白染成红色，但是这种方法的专一性不够好，因为糖蛋白、DNA 和 RNA 也能被染成蓝色，且灵敏度低于 ELP 方法。用电泳转移[118]和对酸性磷蛋白的三价金属螯合作用也可以检测磷蛋白[115,119]。

(3) 脂蛋白

脂蛋白可以使用常规的染色方法。但为了区别于其他蛋白，通常在电泳前进行预染色。苏丹黑 B（Sudan black B）是常用的染料。电泳后用苏丹黑 B 染色可采用 Prat[120]的方法。尽管银染色对脂蛋染色缺乏专一性，但它是最灵敏的[68,121]。

Smejkal 等[122]报道了一种双染方法，先用染料（filipin）在 37℃ 染色 5 分钟，可检测低至 20ng 的低密度脂蛋白，随后再进行考马斯亮蓝染色以检测其他蛋白。这是一种发荧光的染料，灵敏度高，染色速度快，并且不会影响随后的考马斯亮蓝染色，这样便可在一块凝胶上同时检测脂蛋白和其他蛋白。

(4) 血红蛋白和其他含铁蛋白

血红蛋白，转铁蛋白和其他含铁离子的蛋白能用多种方法检测。Clarke[123]用含有联苯胺和 0.2ml 醋酸溶解在 100ml 水中，再用 30%过氧化氢处理，30 分钟后出现蓝带。

4,7-二苯-1,10-菲咯啉（4,7-diphenyl-1,10-phenanthroline）是检测含铁蛋白的灵敏试剂[124]。凝胶被浸在含有 0.01%菲咯啉和 0.02%醋酸钠溶液中约 1～2 小时，加 0.1ml 巯基醋酸盐。几分钟后用 2%醋酸淋洗凝胶。含铁蛋白呈红色带。

用普鲁士蓝（prussian blue）反应[125]检测铁蛋白的方法相当简便。将凝胶浸在溶于 2%盐酸中的 2%普鲁士蓝溶液中约 1 小时，然后用蒸馏水洗脱便可。

血红蛋白和珠蛋白复合物的染色可以用联苯胺[126]、四甲基联苯胺（tetramethylbenzidine）[127]和孔雀绿（leucomalachite green）[127]染色。前二种染料有毒，且四甲基联苯胺染色结果不能保存。孔雀绿染色虽灵敏度不如前者，但操作方便。将 1g 孔雀绿溶解在 100ml 冰醋酸和 150ml 蒸馏水中和锌粉一起煮沸，直至染液无色，保存在 4℃ 备用。将凝胶在染液中染 10 分钟，再转移到 2%过氧化氢或硼酸钠的饱和溶液中，直至显示出蛋白带为止。

(5) 铜蛋白和其他蛋白

含铜蛋白可以用茜素蓝 S（alizalin S）[128]检测，蓝色的带表示铜的存在。检测含铜蛋白的另一种方法是将凝胶放在0.2mol/L半胱氨酸中约 3 小时。接着再放在含有 0.1% 2,2′-奎宁酮（2,2′-bisquinoline）的冰醋酸中，品红色表示有铜

蛋白的存在[129]。

Moens 等[130]发展了一种检测后叶激素运载蛋白（neurophysins）的方法，这种方法是用醛缩品红反应，可专门用于检测高胱氨酸含量的蛋白。

4.2.4.6 同工酶染色

由于同工酶谱的分析比蛋白电泳谱的分析要容易得多，且同工酶谱在基础研究和农、林、牧、副、渔、医、药、食品分析中应用十分广泛，所以是一种非常有用的检测方法。

常规聚丙烯酰胺凝胶电泳的重要特点是在电泳过程中可以保持蛋白质的生物活性，包括酶活性，这就给常规聚丙烯酰胺凝胶电泳的同工酶检测创造了最基本的条件。纵然如此还必须避免电泳过程中由于条件不适而产生的蛋白变性，所以要选择合适的缓冲系统（包括 pH 和离子强度）；对热敏感的酶在电泳过程中要使用冷却系统；在结束电泳，关掉电源后，蛋白区带容易扩散，所以必须尽可能快地进行同工酶的染色。

同工酶染色方法可以分为几类：

1）经典的同工酶染色是将凝胶切成小块，浸泡在合适的缓冲液中进行扩散洗脱。酶反应后，可做酶活性的定量测定。这种方法适合大体积的样品的分析。如果活性带紧靠，则会影响分辨率。

2）在有些情况下，由于酶的催化反应使无色的物质化学转换成有色物质，如羧基酯、酰胺和萘酚的磷酸酯它们可分别被作为底物检测酯酶、酰胺酶和磷酸酶。有两种方式进行化学转换：一是将凝胶浸泡在含有底物和重氮盐的溶液中染色；二是先将凝胶浸泡在底物缓冲溶液中，然后再转移到重氮溶液中。前者称为“同步偶联方法”（simultaneous coupling method），后者称为“温浴后-捕获方法”（postincubation-capture method）。前一种方法较好，因为不容易扩散，并且不需要作再一次保温。

3）底物或引物包含技术（substrate or primer inclusion technique）。有时大分子底物或引物很难进入凝胶，所以大分子底物与酶的反应只能在凝胶表面上进行。为了克服此问题，在灌注凝胶时可以将大分子底物配在凝胶中再进行电泳。电泳后将凝胶浸泡在合适 pH 的缓冲液中，对大分子底物染色。脱色后，有色的带便是有酶活性的带。使用这个技术有两个重要的规则需要注意，即底物在电泳时必须不迁移，不降解。如果核酸被加在聚丙烯酰胺凝胶中，不会出现问题，因为能使蛋白质迁移的合适的凝胶浓度不能使核酸分子移动，所以用 DNA 和 RNA 作为底物使用这种技术可检测核糖核酸酶或作为引物可检测 DNA 聚合酶。

4）指示凝胶技术（indicator gel technique）。这个技术可用于醋酸纤维素膜电泳或聚丙烯酰胺凝胶电泳。如果必须使用大分子底物检测酶活性，可在电泳后

使用含有底物的指示胶。在合适的缓冲液及辅助因子中和分离胶的两个表面接触，保温这个“三明治”，再对分离胶中的酶染色，这个方法使酶带的位置接触染色。指示胶通常由淀粉或琼脂组成，有时还可以用滤纸，很少用聚丙烯酰胺。这个技术也可用于与低分子质量底物结合的酶的检测。

5）在有的情况下酶的检测要通过一个辅助酶的转换而产生颜色。在电泳后检测酶时，酶催化反应介质的 pH 是非常重要的。如果电泳是在远离合适酶反应的 pH 完成的。那么在检测前应将酶放在合适 pH 的冷的缓冲液中，用凝胶扫描仪扫描同工酶谱，其吸收峰面积即表示酶的活性。也可以在缓冲液中洗脱酶带，再在分光光度计上测量酶活性。后者方法麻烦，且不准确。

经典方法测量酶活性，其酶的量是一个限定因子。在凝胶中测定酶活性，底物必须扩散到凝胶中。底物进入凝胶的比例决定了底物的浓度。如果在保温混合液中，底物浓度逐渐减少，则进入凝胶的底物也会逐渐减少。为了避免这种情况，必须使用大体积的反应混合液。底物的转换开始于底物和酶的接触。在凝胶中某一点底物的浓度决定于底物的比例和酶反应的速率。没有反应的底物分子进入凝胶的深层，由于高酶浓度的影响，它们将很快的转换，所以底物不仅能从凝胶表面直接垂直地和酶带接触，而且能从带的侧面接触。而且酶分子可以在保温时被固定，但也可能在保温时扩散出来，其结果可能在酶带的周围形成一个边缘。这种边缘的形成会引起扫描时的误差，所以酶谱的定量测定不像一般蛋白谱，必须谨慎。当然大部分情况下，电泳带中的酶的含量与峰的面积是有线性关系的。

Fritz 等[131]在实验中观察乳酸脱氢酶同工酶的量决定于电泳时所加的蛋白量。但是用电泳方法测量的比例和用其他方法得到的结果不同。在聚丙烯酰胺凝胶中，小量的酶显示了相对较高的酶活性，这可能是由于底物和偶联试剂进入较慢。Cremer 等[132]在 6-磷酸葡萄糖脱氢酶的实验中却没有观察到这种现象，这可能是因为底物、辅酶和偶联试剂等很快进入凝胶的原因。

脱氢酶类的染色通常是将凝胶浸泡在作为最终电子受体的四唑（鎓）盐（tetrazolium salt）溶液中，如硝基蓝四唑鎓（nitroblue tetrazolium，NBT），甲基噻唑四唑鎓（methyl thiazolyl tetrazolim，MTT）或别的合适的四唑鎓盐而被还原产生有色的甲腊（formazan）。吩嗪硫酸甲酯（phenazine methosulfate，PMS）有时被作为还原辅酶或酶取代基和四唑鎓之间的氢化物离子载体。因为四唑鎓盐是光敏的，所以需要在暗室中保温。

水解酶类常常采用在酶反应后能产生颜色或发荧光的产物即具有生色团或荧光团的物质来检测。转移酶类和同分异构酶类不能使用这个方法，通常同时需要一个偶联酶，以检测其混合物。由于偶联酶很难进入聚丙烯酰胺凝胶，仅能在凝胶表面产生颜色，常常用琼脂糖、琼脂或聚酯膜铺在聚丙烯酰胺凝胶表面来完成反应。

现在酶染色已使用丁子香酚（eugenol）和四羧酸盐（tetrabase）来替代有潜

在危险的致癌试剂，如联苯胺和 *O*-联茴香胺（*O*-dianisidine）。并且越来越普遍的是使用荧光标记物质，如伞形化合物（umbelliferyl）或丹磺酰衍生物。

有关同工酶的文章和出版物很多。早在 1970 年 Shaw 等[133]便列示了各种同工酶的染色配方。以后 Harris 和 Hopkinson[134]也给出了同工酶的染色方法，并且逐年不断增补。有时一种酶可以有几种不同的染色方法。且用于淀粉凝胶的方法可同样用于聚丙烯酰胺凝胶。Rothe 等[135]和 Heeb 等[136]对聚丙烯酰胺凝胶同工酶的染色方法进行了综述。Gaá 等[137]在书中详述了各类同工酶，包括脱氢酶类、过氧化物酶类、转移酶类、还原酶类、水解酶类、磷酸酶类、多肽酶类、蛋白酶类和裂解酶类的染色原理和方法。Hames 等[138]则列示了近二百种同工酶染色方法的文献。

作者利用同工酶染色的技术曾检测不同种鱼、羊、蜜蜂[139]的各种同工酶，以对它们的分类，遗传变异进行研究。同时利用不同类型化合物对酯酶同工酶活性的抑制程度研究药物的毒理作用[140]和寻找棉铃虫和烟青虫的种群分化及遗传关系[141]。在法医学研究方面，利用酯酶 D 和酸性磷酸酶对人血清进行快速分型[142]。

有关同工酶染色的技术仍在不断发展。Vargiec等[143]在变性或不变性的聚丙烯酰胺凝胶电泳后，用 α-萘吡喃葡萄糖苷（α-naphthylglucopyranoside）作底物，酶反应得到的 α-萘酚用快红 B（fast red B）或快蓝 BB（fast blue BB）染色，快速而简单地测定了外-β-1, 3-葡聚糖酶（exo-β-1, 3-glucanase）的活性。Kalix 等[144]用含有底物羧甲基-curdlan［一种和染料 Remazol 亮蓝（RBB）交联的多糖］的凝胶进行聚丙烯酰胺凝胶电泳，电泳后便可直接得到植物萃取液中多个 β-1, 3-葡聚糖酶同工酶带的相对定位，并可同时测定酶活性。β-葡聚糖降解同工酶（β-glucan degrading isozymes）是大麦中 β-葡聚糖水解的专一酶。对其多型性可用含有 β-葡聚糖（β-glucan）或地衣多糖（lichenan）的凝胶电泳后，用刚果红（Congo red）染色便可得到清晰的同工酶带[145]。利用葡萄糖、果糖、甘露糖和葡萄糖-1-磷酸盐的释放活性，可在电泳后检测糖苷酶和糖基转移酶。

甘氨酸-*N*-甲基转移酶（glycine-*N*-methyl transferase）是大量存在于哺乳动物肝脏中的一种蛋白。Santos[146]介绍了一种专一的酶谱检测方法。这是通过甘氨酸的甲基化作用产生的肌氨酸来检测的。

peyronel 等[147]用偶氮酪蛋白（azocasein）在电泳后检测蛋白酶，方法十分简单快捷。电泳后将凝胶保温在有三氯醋酸的偶氮酪蛋白溶液中，再用氢氧化钠处理，便可在橙色背景上得到无色的带。凝胶可在三氯醋酸中保存几个月。这个技术对丝氨酸蛋白酶、酸性蛋白酶和金属蛋白酶的检测可以得到很好的结果。甚至可在 SDS 电泳后检测。灵敏度可达亚微克量水平。

King 等[148]详细地给出了得到高分辨率瓜氨酸同工酶的各种电泳条件，包括缓冲系统、凝胶配制、样品萃取、电泳条件和定性、定量检测方法。

Alonso 等[149]用钌红（ruthenium red）在 20 分钟～1 小时简便并灵敏地检测

果胶酯酶（pectin esterase）。作者等[142]用发荧光的伞形化合物检测了人血红蛋白中的酯酶D和酸性磷酸酶。Karssen 等[150]通过酯酶和苹果酸脱氢酸的分析来辨别土豆中的胞囊（cast）和根-团-线虫（root-knot-nematodes）。

碱性核糖核酸酶的检测可以将含有底物 RNA 和溴化乙锭（ethidium bromide）的琼脂糖干膜覆盖在凝胶上进行。灵敏度可达 0.5ng，并可同时进行核糖核酸酶的抑制实验[151]，Randeniya[152]用酶染和免疫方法检测了松柏醇氧化酶（coniferylalcohol exidase）和等电点约为 9 的漆酶（laccases）。

Aledo[153]等对膜蛋白在两种不同系统（Triton X-100 和 CHAPS）中进行聚丙烯酰胺凝胶电泳后，基于谷氨酰胺酶的活性用新的方法检测了膜蛋白中的酶的存在，最小检测量为1～5μg的 PAG（phosphate-activated glutaminase）活性。

同工酶染色方法适用于各种电泳，包括常规聚丙烯酰胺凝胶电泳、等电聚焦、滴定曲线，有时甚至还适用于 SDS 电泳。

4.2.4.7 荧光探针法

与同位素标记的放射性检测方法相比，荧光探针方法虽然在灵敏度上稍有逊色，但它标记时不需要合成，检测手段方便，更没有放射性的危险，所以蛋白质检测，甚至核酸检测都尽可能避免使用放射性方法。如核酸定序过去都采用放射自显影方法，而现在则采用激光荧光方法便是实例。

荧光探针实际上也是一种蛋白染色，其特点是染料本身或反应产物在一定环境中必须是发荧光的。荧光探针方法可分为电泳前预标记和电泳后再标记两种方法。电泳前预标记蛋白的方法最早使用的荧光探剂是丹磺酰氯（dansyl chloride)[154,155]，后来用的比较多的是荧光胺（fluorescamine)，全称是{4-phenylspiro-[furan-2(3H),1-phthalan]-3,3′-dione}[156～159]。因为游离的荧光胺和它的水解产物都不发荧光，只有当它结合到蛋白质上时才发荧光，这样就不会有荧光背景的问题，所以它最主要的优点是检测灵敏度高，约 5ng 的蛋白便可在暗室中用紫外灯检测。它的缺点是当它和蛋白质发生反应时，它会转换一个氨基到羧基上，所以会改变蛋白在常规聚丙烯酰胺凝胶电泳和 SDS 电泳中的迁移率[159]。虽然也有作者观察到此蛋白的迁移率 R_f 和以 10 为底的分子质量的对数仍然有线性关系[156]。

荧光探剂 MDPF，全称 2-甲氧基-2,4-二苯-3(2H)-呋喃［2-methoxy-2,4-diphenyl-3(2H)-furanone］(157,160,161)的优点是被标记蛋白的荧光在聚丙烯酰胺凝胶中能保持几个月，但荧光胺只能保持 24 小时。使用 MDPF 作探剂时，蛋白的迁移率和分子质量的对数之间的线性关系在 1～500ng 范围内。DACM 即 *N*-(7-二甲基胺-4-甲基香豆素）马来酰亚胺［*N*-（7-dimethylamino-4-methylcoumariny）maleimide］[162]和 OPA 即邻苯二甲酸二醛（*O*-phthaldialdehyde)[163]也可作为蛋白的预荧光标记的探剂。OPA 的灵敏度比荧光胺高 10 倍。

OPA[164,165]和荧光胺[166]也可用于电泳后的蛋白荧光标记。OPA和ANS[167]，（1-苯胺-8-萘磺酸盐，1-aniline-8-naphthalene sulphonate）可用于制备凝胶电泳后蛋白带的迅速定位。使用OPA作荧光探剂的简单方法是将电泳的凝胶浸泡在β-巯基乙醇溶液（100ml 0.1mol/L pH8.5巴比妥钠缓冲液或磷酸缓冲液含70～80μl β-巯基乙醇）中约10～25分钟。在OPA溶液（在2ml甲醇中加20mg OPA）中暗环境放置15分钟便可用紫外灯在365nm观察荧光带。使用ANS的简便方法是将凝胶浸在0.003%（W/V）ANS/0.1 mol/L pH6.8磷酸缓冲液中约5～10分钟便可在紫外灯下观察荧光带。但是这种方法不灵敏，大于20μg的蛋白才能呈现荧光。

Bis-ANS，全称［双(8-对-甲苯氨基-1-萘磺酸盐)］，［bis(8-p-toluidino-1-naphthalene sulphonate)］已被报道在SDS电泳后用于检测比ANS灵敏，特别是当有阳离子（如氯化钾）存在时，0.5μg蛋白便能被检测到[168]。OPA则更灵敏，约0.25μg的蛋白便能在紫外灯下见到，且大部分酶的活性仍被保持[164]。

利用荧光淬灭的原理也能灵敏地检测蛋白带。有时电泳后用紫外灯也可以直接观察到蛋白带而不需要加任何探剂，但只有富含色氨酸的蛋白才能进行荧光的直接观察。

正如4.2.4.6节所述，目前在同工酶染色中使用荧光标记越来越普遍。作者等[142]即是用发荧光的四甲基伞形化合物的磷酸盐和醋酸盐分别检测酸性磷酸酶和酯酶D。β-1,3-葡聚糖同工酶[144]和β-葡聚糖降解同工酶[145]也都可用荧光方法检测。

由于基础科学研究的需要和市场的兴趣，关于糖化物的结构与功能研究正受到人们的关注。而荧光标记糖化物的电泳分析是一个高分辨和灵敏的方法。Jackson[112,113]对此进行了专门的论述。

利用荧光染色进行蛋白质分析具有高灵敏度、精确定量和线性动态范围宽等特点，并且操作简便，稳定性高，安全。近年来使用的SYPRO橙、SYPRO红和SYPRO Ruby和Tangerine是快速高效的荧光染料。特别是最近由Bell和Mackintosh介绍的Deep Purple比Sypro Ruby灵敏度高8倍，并且背景极低。染色方法参见8.3.15节。

虽然荧光检测方法是一种灵敏而又方便的方法，但并没有像考马斯亮蓝、银染和各种同工酶染色那样被广泛采用，这可能是由于保存结果困难且受扫描设备限制的原因，因为照相结果不理想，并且一些商品凝胶扫描仪不能进行荧光扫描。

目前，荧光技术为基因组学和蛋白质组学研究提供了高灵敏、高通量的手段，所以正在迅猛的发展，请参阅8.3.14节和8.3.15节。

4.2.4.8 免疫方法

只要具有单特异性抗体，使用免疫方法检测是比较简便而又具有专一性的方

法。将电泳后的凝胶用含有专一性抗体的溶液浸湿，保温，再用抗 IgG 偶联到辣根过氧化物酶上（horseradish peroxidase）[169]。进一步在 3,3′-二氨基联苯胺（3,3′-diam inobenzidine）和过氧化氢中保温，抗原-抗体-过氧化酶复合物就像染色的蛋白带一样清晰可见。当然更灵敏的方法是用放射性标记的抗体与凝胶中的抗原反应。采用双抗体方法则更为专一化。

比较简便的方法是将含有抗体的琼脂糖凝胶直接铺在聚丙烯酰胺凝胶表面，接着进行电泳。抗原从聚丙烯酰胺凝胶中扩散出去和琼脂糖中的抗体发生反应，产生免疫沉淀谱型，叫做免疫复制（immunoreplica）[170]，然后用前述方法染色或用放射性标记的蛋白 A 检测[171]。最近 Flesch 等[172]将细胞表面蛋白进行生物素作用（bio-tinylation）和免疫沉淀（immunoprecipitation）后电泳来鉴别细胞表面抗原。

现在最常用的方法是将电泳分离后的蛋白抗原通过电印迹（electroblotting），转移到一种膜或滤纸上，然后用合适的抗体进行免疫检测（immunoassay），称为免疫印迹（immunoblotting）。一些同工酶染色的方法，也同时采用了免疫转移方法，如松柏醇脱氢酶和漆酶[152]，碱性磷酸酶[151]和 β-葡聚糖降解酶[145]。Kido 等[173]对 Gc 的检测和 Suen 等[174]对抗原俘获（antigen capture）的检测也采用了免疫转移。

免疫检测最为简单的方法是将含有抗体的滤纸、醋酸纤维素膜或琼脂糖凝胶直接铺在电泳后的聚丙烯酰胺凝胶上，保温并进行蛋白染色，这个技术称为免疫固定（immunofixation）或免疫转移（immunotransfer）。作者等[175]用这个技术研究了北京地区人血清 Gc 亚型的频率分布。Arnaud 等[176]用这个技术检测了血清中 α_1-蛋白酶抑制剂，并对方法作了改进。Marshall[177]比较了免疫固定和免疫电泳方法对鉴别血清中单克隆抗体 IgG、IgA 和 IgM 的能力。结果表示当这三种单抗隆抗体在血清中含量低的情况下，免疫固定技术给出高分辨的结果，而免疫电泳给出不明确的结果，并指出免疫固定最好保温在 40℃。

4.2.4.9 电泳转移

电泳转移检测请参阅第 11 章。

4.2.4.10 电泳后蛋白带的氨基酸分析

常规聚丙烯酰胺凝胶电泳后，如果能得到感兴趣的单一蛋白带，可以进一步进行氨基酸的组成分析。

电泳分离后，水解前，将感兴趣的蛋白质片段洗脱，一般有 5μg 的蛋白质即可以进行氨基酸分析。为考虑聚丙烯酰胺凝胶中不纯物的影响，可以用空白的凝胶片段进行平行分析。电泳分离后的染色蛋白带也可以不进行洗脱，直接用酸水解，约 5～10nmol/L 的蛋白质便可在氨基酸分析仪上进行分析[178,179]。聚丙烯

酰胺凝胶水解时产生大量的氨会妨碍碱性氨基酸的测定并损害仪器。克服的办法是上样前将酸性水解产物在5%碳酸钠中重复冷冻干燥[180]。肽图和氨基酸序列分析通常在SDS电泳后进行。请参阅5.2.4.7节。

4.2.5 照相、凝胶干燥

为了发表文章和分析结果的保存，应将有价值的结果在干燥以前先进行照相，以免在干燥时降低分辨率，甚至失去弱带。

凝胶可直接放在带有乳白色屏幕的发光板上，使用细颗粒的全色胶卷和一个中红滤片照相，以增加蛋白带和背景的反差。

虽然平板凝胶可存放在含有7%醋酸的密封的塑料袋中。但是即使如此也只能保存1～3个月，且占有空间太多，不易保管。

凝胶干燥目前有两种方法，厚度大于约1.0mm的凝胶为防止日后凝胶的龟裂，应该用凝胶干燥仪进行干燥。厚度小于1.0mm的凝胶则可采用自然干燥法。采用凝胶干燥仪干燥，如第3章3.6节所述参照说明书操作。一个好的凝胶干燥仪应有足够大的尺寸，内装加热器和定时器，能抽真空。根据进一步处理的需要，可将凝胶干燥在支持膜上或滤纸上。前者透明，后者不透明。

随着电泳技术的不断发展，薄层平板凝胶正在替代厚胶。在凝胶干燥保存这一点上，薄胶也体现了它的优点[181,182]。不需要用凝胶干燥仪，采用自然干燥方法也可以长期保存而不会龟裂。通常将凝胶浸泡在用脱色液配制的3%～10%的甘油溶液中约半小时左右，视凝胶的pH，浓度和厚度而定。将带有支持膜的凝胶晾在平板玻璃上室温过夜（待凝胶发黏便可，时间视当地的温、湿度而定），用保存液浸湿过的玻璃纸或一块透明的塑料膜包在凝胶上，晾干，以上操作避免陷入气泡[44,182,183]。如果在上面再压一块玻璃，可使干燥后的凝胶更平整，但会延长干燥时间。对没有支持膜的凝胶在保存液中浸泡后，先将凝胶铺在塑料膜上，再用保存液浸湿的玻璃纸包裹，组成“三明治”，再用玻璃板压紧，晾干。

4.2.6 定量测定

不管是使用凝胶扫描，还是摄录系统，凝胶电泳后通常要进行染色，才能进行定量测定。没有染色的凝胶只能用带有紫外光源的凝胶扫描仪才能定量。

如果电泳后要对样品组分进行定量测定，必须注意以下几点。

1) 已知和未知样品必须使用相同的溶剂系统，相同的浓度，相同的加样量，并在同一块凝胶上电泳和染色。
2) 在凝胶上扣除背景常常不像在分光光度计中那么容易，因为后者的样品是溶液，而前者在凝胶上可能脱色不均匀，所以必须按说明书采用合适的方法扣

除背景。

3) 对未知、已知样品扫描和进行数据处理时应该采用相同的参数。

4) 选择合适的染色方法，以使样品的浓度和吸光度的关系在线性范围内。

5) 一些畸变的带不能进行准确定量。如由于固定和染色方法不合适或时间不充分而造成蛋白带的中心未被染色；不合适的固定方法和过量加样而造成的“晕轮”效应（holo effect）；样品没有充分溶解而造成的“纹理”（streaky）现象；凝胶聚合不均匀，凝胶中的气泡，电泳时冷却不充分而造成蛋白带的弯曲畸变等。

如果电泳后进行分子质量的测定，以上因素的影响较小，但仍然要注意。如果定量扫描后进行神经网络分析，电泳操作的影响较大，作者[126]通过对人血清中触珠蛋白电泳图谱的扫描分析和数据处理探索了这方面的技术问题。

4.3 实验考虑

4.3.1 电泳方法和方式的选择

要做好一个电泳实验首先要根据实验目的和各种电泳的分离原理选择合适的电泳方法。常规聚丙烯酰胺凝胶电泳主要是根据大分子的电荷性质（决定选用阳极电泳或阴极电泳），电荷多少（选择缓冲系统）和分子的大小（选择凝胶浓度，特别是梯度胶范围）来进行分离的。虽然它的分辨率不如等电聚焦电泳高，但它不像 SDS 电泳那样会使蛋白质变性。电泳后蛋白质保持其生物活性，可进行各种检测。所以常规聚丙烯酰胺凝胶电泳适合于分离各种欲保持其天然蛋白质活性的物质如酶、激素、抗原等，而且可用于测定球状蛋白质的分子质量。

如第 3 章所述，目前电泳方式有圆盘电泳，垂直电泳和水平电泳三种。如果条件许可，水平电泳，特别是半干电泳是可取的方式。因为它具有操作方便、节省材料、电泳速度快等优点。

4.3.2 最佳凝胶浓度和缓冲系统的选择

根据 2.4 节和 4.1.4 节选择最佳凝胶浓度，再根据 2.1 节计算凝胶浓度和交联度。凝胶浓度低，胶软且影响分辨率。虽然高浓度凝胶可以保证分辨率，但浓度太高、胶脆、易龟裂。而且由于高浓度凝胶孔径小，有可能在电泳时使大分子蛋白无法进入凝胶而仍然停留在加样位置或造成电泳时的拖尾。梯度凝胶的分子筛效应是提高分辨率的理想方法。

样品缓冲液，凝胶缓冲液和电极缓冲液的选择原则是保证样品的溶解度，稳定性，生物活性以及电泳的速度和分辨率，详见 4.1.3 节。

蛋白质分子都有阳离子和阴离子基团，这些基因的解离常数各不相同。它们的静电荷取决于环境的 pH，pH 将影响分子的迁移率，且迁移率与环境的离子强度的平方根成反比。低离子强度时，迁移速率快。高离子强度时，迁移速率慢，但电泳带比低离子强度时细窄。在高离子强度时，由于高导电性产生大量的热，使离子迁移速度增加，但也引起离子扩散。与此同时，介质的黏度随着温度增加而减小，电阻减小，电流增加，热也进一步增加。所以缓冲液离子强度的选择是很重要的。它还与加在电泳系统中的电参数密切相关。如果输入太高的功率（高电压），会产生太多的热，就可导致介质的溶剂蒸发，使蛋白变性。如果输入太低的功率，虽然可以克服由于热产生的问题，但是由于扩散量增加，会导致分离结果差和电泳时间太长。

4.3.3 凝胶聚合不佳的原因和对策

4.2.1.1 节和 4.2.1.2 节中列述了凝胶的各种聚合方法。通常凝胶聚合应在 30 分钟到 1 小时内完成。过快地聚合表示过硫酸铵或（和）四甲基乙二胺用量太多。此时凝胶太硬易龟裂，且在电泳时易烧胶。聚合太慢，甚至不聚合，则表示此两种试剂的用量不够，或凝胶系统中的试剂不纯或者已经失效，特别要注意过硫酸铵的生产日期。

聚合与很多因素有关（详见第 2.3 节），所以应根据当时的条件（如室温）来修改引发剂和增速剂的用量。一定要用双蒸水配制溶液，并除去溶液中的气体。从冰箱中取出的单体贮液要待平衡到室温时再配制。

由于过硫酸铵和四甲基乙二胺的引发和增速作用需要在碱性条件下发生，所以酸性丙烯酰胺的聚合比较困难，特别在 pH4.5 以下，最好加 0.6% 硝酸银[182,183]或采用光聚合的方法。近几年，Rabilloud 等[77,184,185]、Lyubimova 等[186,187]和 Righetti 等[188]用亚甲蓝（methylene blue）作引发剂，苯甲亚磺酸钠（sodium toluenesulfinate）作还原剂，二苯氯化碘（diphenyliodoniumchoride）作氧化剂，对酸性条件下的丙烯酰胺的光聚合方法进行了讨论。

灌注梯度胶时要选择适当的搅拌速度。搅拌速度过快，产生气泡，影响聚合。在电泳时凝胶中的气泡会使电泳带畸变。搅拌速度过慢，溶液不能混匀，特别是甘油。此外还要选择合适的流速（即梯度混合器和灌胶模具的相对位置）。如果流速太快，凝胶液流会冲坏梯度。如果流速太慢，则易在灌注时聚合。

聚合后采用的洗胶方法有利于提高电泳的质量。这是在聚合后用双蒸水多次漂洗凝胶，以除去未聚合的单体丙烯酰胺，甲叉双丙烯酰胺和未反应的过硫酸铵和四甲基乙二胺。然后再进行电泳[10,142,175,181,189]，如果为了长期保存，先将聚合和漂洗后的凝胶抽干，使用前再用合适的凝胶缓冲液浸泡至原来的厚度即可，但这种方法只适合于水平平板电泳用的凝胶。

凝胶聚合的质量不仅影响电泳和染色，而且凝胶聚合的重复性对电泳后的定量扫描分析的准确性也是重要的限定因素之一。凝胶聚合后最好放置一定时间后再使用。特别是梯度胶最好在4℃过夜后用，以使凝胶充分成孔，利于电泳分离。实验室灌注的聚丙烯酰胺凝胶一般在4℃和一定湿度的环境中可保存一周。如果采用真空密封保存或干胶保存，则可在4℃保存更长的时间。

4.3.4 样品的预处理

样品的预处理是电泳成功与否的关键，是造成电泳中常见拖尾现象的原因所在。上样前最好将样品先离心，特别是对那些在冰箱中保存时间较长的样品。对样品缓冲液的选择，样品浓度的确定，加样方法的选用请参阅4.2.2节。

4.3.5 阳极电泳和阴极电泳

由于蛋白质的等电点大多在中性范围，所以聚丙烯酰胺凝胶电泳大多采用阳极电泳。这是将样品溶解在碱性pH缓冲液（如pH 8.9左右）中，按带负电的多少和分子的大小、形状来分离以不同速度向阳极移动的蛋白质分子。为了提高酸性蛋白的电泳分辨率，也可使用酸性pH缓冲系统，如pH 4.8，同样根据向阳极移动的迁移率来分离。作者[10]比较了用这两种缓冲系统分离各种动物血清的电泳图谱。虽然用pH 8.9缓冲系统可以得到较多的蛋白带，但是用pH 4.8液冲系统得到的电泳图谱分辨更好，更加清晰。对一些等电点大于pH 8的碱性蛋白，为了使被分离成分之间有较大的净电荷量的差别而提高分辨率，便可溶解在酸性pH溶液（如pH 5.5）中，使其带正电而向阴极移动，这就是阴极电泳。作者[10]用此方法对一些碱性蛋白，如蝎毒蛋白进行了分离，得到较好的效果。

4.3.6 半干技术

广义地说，半干技术源于1973年瑞典LKB公司的水平薄层等电聚焦电泳，因为根据它的分离原理，电泳时不需要缓冲液。1986年Pharmacia公司用缓冲液琼脂糖凝胶条代替几百甚至几千毫升电极缓冲液和滤纸桥应用于常规聚丙烯酰胺凝胶电泳和SDS电泳。1989年Pharmacia LKB公司在SDS电泳中使用聚丙烯酰胺缓冲液凝胶条代替琼脂糖凝胶条，解决了后者易断不宜用于大长度凝胶的问题。1992年Pharmacia Biotech公司又用缓冲液润湿的滤纸条代替电极缓冲液和滤纸桥，使半干技术进一步简化和节省材料，并且在保证分辨率的前提下，大大缩短了电泳时间[10, 44, 142, 175, 181, 189～191]，见图3.2，所以它是当前最受欢迎的技术。

琼脂糖凝胶条适合于小块聚丙烯酰胺凝胶的半干电泳，凝胶条的配置方法[191]如下。

（1）电极缓冲液　Tris-甘氨酸缓冲液（0.96mol/L 甘氨酸，0.125mol/L Tris）或 Tris-丙氨酸缓冲液（0.88mol/L 丙氨酸，0.25mol/L Tris）。

（2）3%琼脂糖　在电极缓冲液中边搅拌，边加入琼脂糖，浓度为3%，煮沸5分钟，稍冷后倒入欲制形状的凝胶条模具中，自然冷却固化后在4℃保存。

为确保电泳的顺利进行最好使用无电内渗琼脂糖，作者[191]的实验结果表明电内渗大于 $0.08m_r$ 的琼脂糖不宜使用。并且固化后的琼脂糖凝胶条最好在4℃保存2周再使用。电泳时凝胶条代替缓冲液和滤纸桥搭放在聚丙烯酰胺凝胶的两侧。

使用滤纸块进行半干电泳的方法比凝胶条的方法更简便[10]。将凝胶平铺于冷却板上后，分别将用阴极缓冲液润湿的滤纸条和用阳极缓冲液润湿的滤纸条放在凝胶两侧，使其与凝胶搭接5mm。滤纸条用6～8层中速定性滤纸组成，事先用弯头镊子或玻璃棒将滤纸压平，赶走气泡。滤纸条与胶面必须搭接良好，避免气泡陷入。电极搭接在滤纸条上（见图4.14）。滤纸条的长度与凝胶长度相同，宽度约为凝胶宽度的一半。pH 8.9，pH 4.8 阳极电泳和 pH 5.5 阴极电泳用的电极缓冲液组成见表4.14[10]。

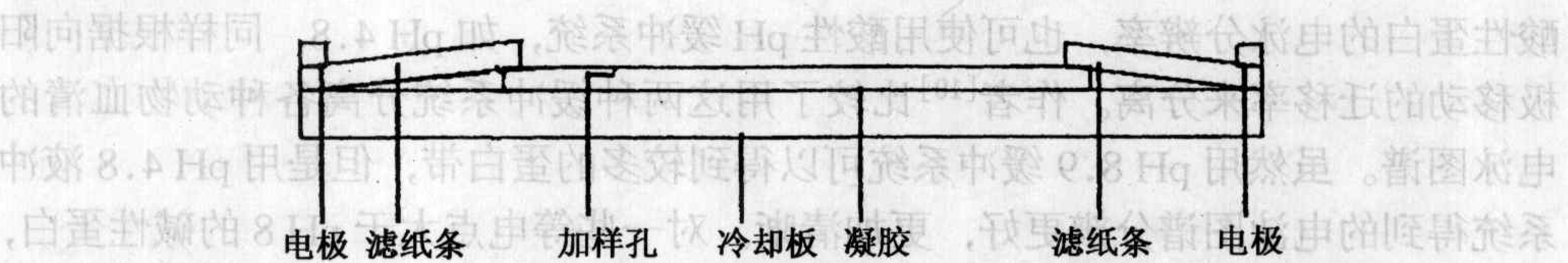


图4.14　电极缓冲液滤纸条的放置

表4.14　pH8.9，pH4.8 阳极电泳和 pH5.5 阴极电泳的电极缓冲液[10]

	pH8.9 凝胶	pH4.8 凝胶	pH5.5 凝胶
阳极缓冲液	pH 8.9，175 mmol/L Tris-HCl 0.01% NaN_3 0.002% 橙黄 G*	pH 5.3，225 mmol/L L-精氨酸-HCl 0.01% NaN_3 0.001%溴酚蓝*	pH 5.8，113 mmol/L ε-氨基乙酸， 5 mmol/L 冰醋酸 0.01% NaN_3
阴极缓冲液	pH8.9，567mmol/L 甘氨酸 0.01% NaN_3	pH5.3，225 mmol/L 三羟甲基甲基甘氨酸 5 mmol/L NaOH 0.01% NaN_3	pH3.6，30mmol/L 冰醋酸 0.01% NaN_3 0.001%碱性蓝*

* pH8.9 电泳的阳极缓冲液中的橙黄 G，pH4.8 电泳中的溴酚蓝和 pH5.5 电泳中的碱性蓝只是为了用颜色区别阴，阳极缓冲液。可用，可不用。

在阳极电泳时，通常在样品中加溴酚蓝作为前沿指示剂。但在阴极电泳时，可用焦宁（pyronine，一种染细胞核的红色染料）。焦宁在酸性 pH 条件下带正电，向阴极移动。吡啰红 B（$C_{17}H_{20}ON_2$，$C_{21}H_{27}ON_2Cl$）和吡啰红 G（$C_{17}H_{19}ON_2Cl$）为略带不同颜色的焦宁，均可作为阴极电泳的前沿指示剂。

4.3.7 检测方法的选择

检测方法的选择首先是根据检测目的，其次是根据样品中各组分的含量。检测酶应选用同工酶染色法，检测抗原应选用免疫法，检测糖蛋白、脂蛋白、铁蛋白等应选用专一的蛋白染色方法。这些检测方法专一性强，有利于将来的结果分析。如选用荧光染色，则可以提高它们的灵敏度。如作全蛋白分析可以用考马斯亮蓝染色和银染色。样品含量达微克级的可用考马斯亮蓝染色。含量为纳克级的最好选用灵敏度高的银染色。但不管是考马斯亮蓝染色还是银染色都有很多不同的方法，如银染色已发表的方法就有 100 多种[60]，应根据样品的性质慎之选用。每种银染有它自己的特点。Oakley 等[59]的方法虽已被广泛使用，但当戊二醛与缓冲液中的甘氨酸反应生成黄色沉淀时会沉积于凝胶表面。非双胺化学显色[64,65]在凝胶表面只有很少的沉淀，并且比较经济。光显色方法比较快，通常在 15 分钟内便能得到图像，但是灵敏度比化学显色方法低，并且常常产生负染而难以定量。所以银染色方法的选择应随蛋白而改变。Merril 等[63]发现光银染色的灵敏度比考马斯亮蓝 R-250 方法灵敏 5～20 倍，化学银染方法则灵敏 10～200 倍。现在大部分研究者都使用非双胺化学银染法。虽然由于银染的灵敏度比考马斯亮蓝高 100 倍而备受青睐，但它的缺点是：

1）对染色所用的水和试剂要求很高，否则会产生高背景。
2）与常规的考马斯亮蓝染色相比，银染色的花费要高得多。
3）实验步骤繁杂，且每一步都必须小心操作。
4）对一些蛋白不能着色，有时还会出现“负染”，因此会使有些蛋白漏检。
5）因为银染同时可以检测 DNA、多糖、脂多糖等，所以不能作为蛋白的专一检测方法。

4.3.8 电泳过程中的不正常现象和对策

如果电源上没有显示电压，则说明电源没有输入电压，保险丝断了或电源故障。如果没有电流或电流很小，则说明凝胶，缓冲液凝胶条（或缓冲液滤纸条）及电极三者之间有气泡，接触不好，甚至没有接触。

如果前沿指示剂向相反方向移动（如阳极电泳中溴酚蓝向阴极移动或阴极电泳中焦宁向阳极移动），则说明电源连接的正、负极错置或缓冲液选择错误。

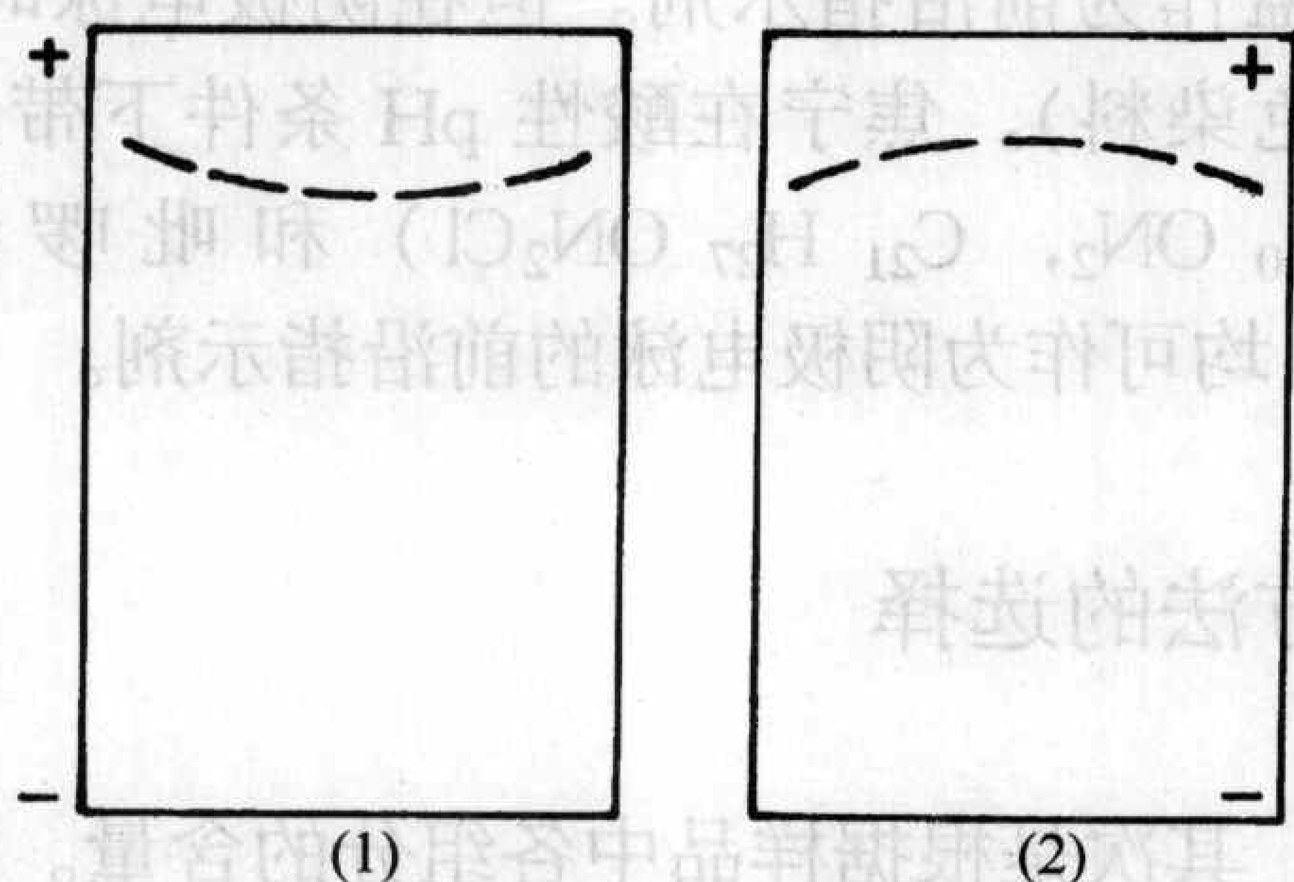


图 4.15　电泳时，前沿指示剂的（1）“微笑”现象；（2）“皱眉”现象

如果指示剂前沿呈现两边向上的曲线形［见图 4.15（1）］，即常称的“微笑”（smiles）现象。则说明凝胶的不均匀冷却，中间部分冷却不好，所以导致凝胶中的分子有不同的迁移率所致。这种情况在用较厚的凝胶以及垂直电泳时常常发生。如果指示剂前沿呈现两边向下的曲线形［见图 4.15（2）］，即常称的“皱眉”（frowns）现象。则常常是由于垂直电泳时电泳槽的装置不合适引起的，特别是当凝胶和玻璃板组成的“三明治”底部有气泡或靠近隔片的凝胶聚合不完全便会产生这种现象。

如果电泳时间比正常要长，则可能是由于凝胶缓冲系统和电极缓冲系统的 pH 选择错误。即缓冲系统的 pH 和被分离物质的等电点差别太小或缓冲系统的离子强度太高。

电泳时电流产生的热是大部分电泳方法的主要问题。即使使用冷却装置，也仍然会在凝胶中产生温度差异。这种温度差异导致相同分子在凝胶的不同部位会有不同的迁移速度，而使蛋白带产生弯曲畸变。特别在使用柱胶和较厚的凝胶时这种现象更为常见。

凝胶厚度、冷却温度、电参数和电泳时间 4 者之间在电泳时存在着依赖关系。电压应根据加在凝胶上电极之间的距离（即凝胶宽度）而定。电流则与凝胶的长度（加样数和加样量）有关。一般来说，常规聚丙烯酰胺凝胶电泳不需要太高的电压，所以对薄层胶来说，温度要求也不高。如果加双倍的电压，从理论上来说，电泳时间可缩短一倍。但实际上由于高电压产生的副作用，并不能达到预期的目的。所以有时采用伏·小时作为电泳时间参数可能更具有实际应用价值。

电泳过程中如果电泳盖上出现冷凝水，则表示加的电压和功率过高。

4.3.9　电泳结果的分析

如果考马斯亮蓝染色后在凝胶表面呈现金属光泽，这是由于凝胶干燥后，不溶解的考马斯亮蓝沉积在凝胶表面所致。此时可将凝胶在洗脱液中漂洗。为避免这种现象，最好在染色后，脱色前用脱色液浸湿的棉花球擦洗凝胶表面。

有时在样品泳道，甚至整块凝胶出现不规则的染色区，这通常是由于缓冲系统被污染所致。如果在凝胶边缘出现污渍，则是由于操作时留下的指纹所致。

如果电泳时，样品不能进入凝胶。在加样处，染色带很深，有时甚至在表面见颗粒状，这可能是由于样品分子质量太大，或在缓冲液中凝聚，或溶解不好，

或在浓缩胶中形成高浓度的蛋白区带而发生沉淀。此时应选择连续电泳和降低样品浓度。另外应选用合适的凝胶浓度以使凝胶孔径适合分子大小。

蛋白带畸变的原因是很多的。如4.3.8节中所述，由于电泳时冷却不好，凝胶中有温度梯度，前沿出现“微笑”现象。或由于电泳装置的原因出现“皱眉”现象一样，染色后，有时蛋白带也会出现同样的现象。另外，可能是由于凝胶中的丙烯酰胺和甲叉双丙烯酰胺溶解不好，或抽气不充分，聚合后凝胶孔径不均匀或陷入气泡，这都将引起蛋白带畸变，所以选用好的试剂，过滤及抽气是必要的。

“拖尾”（tailling）现象是电泳中最常见的现象，见图4.16。这常常是由于样品溶解不佳引起的。克服的办法是在加样前离心，选用合适的样品缓冲液和凝胶缓冲液，加增溶辅助试剂。另一方法是降低凝胶浓度。

“纹理”（streaking）现象，见图4.17，常常是由于样品中的不溶颗粒引起的。克服的办法是增加溶解度和离心除去不溶性颗粒。

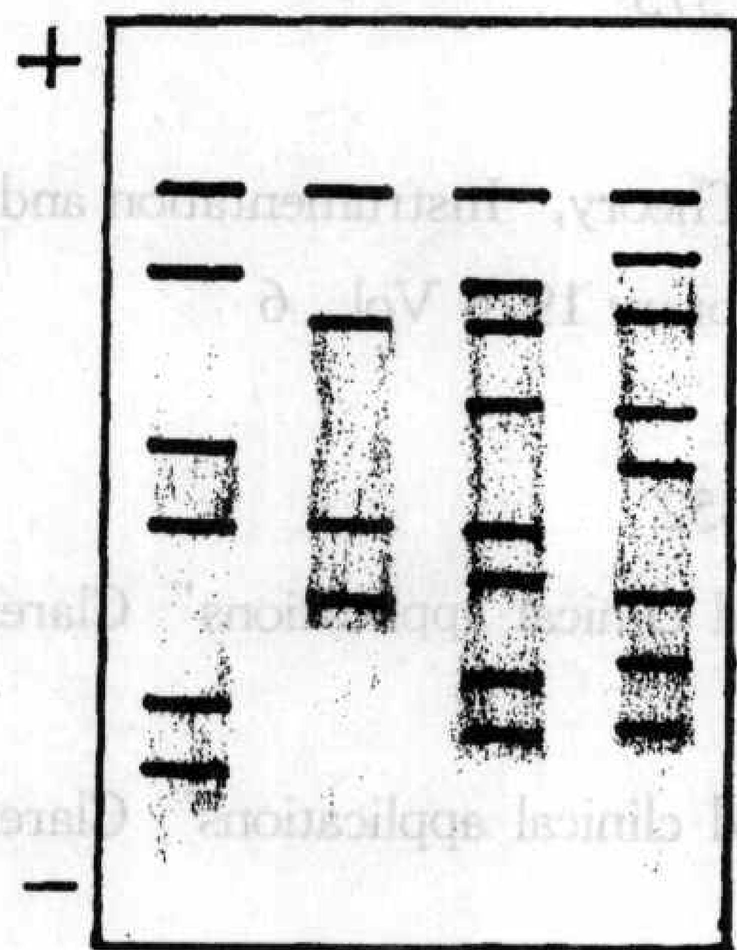


图4.16　“拖尾”现象

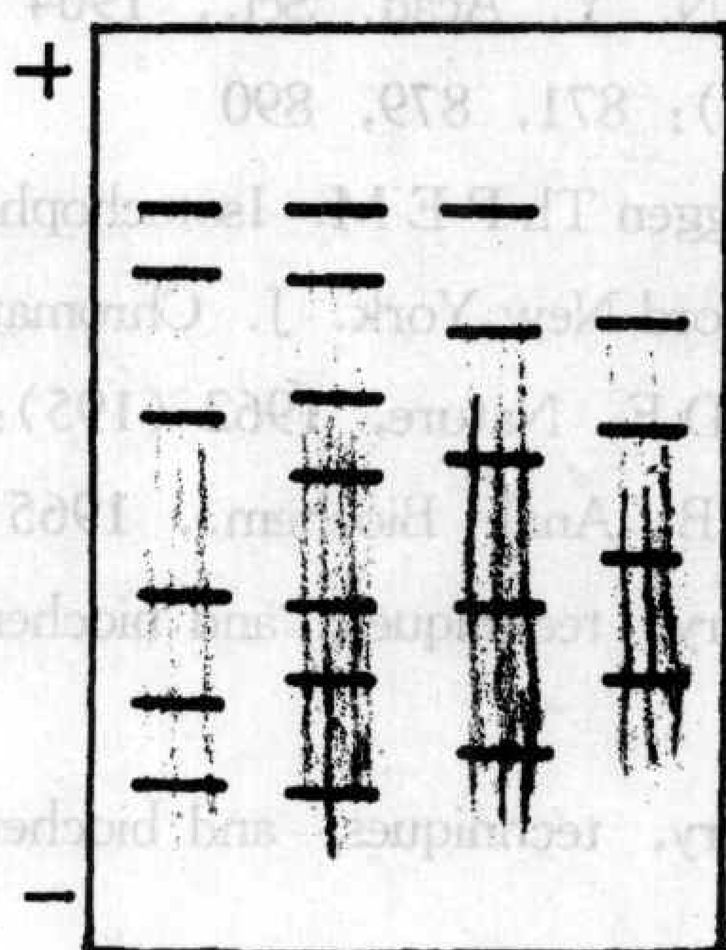


图4.17　“纹理”现象

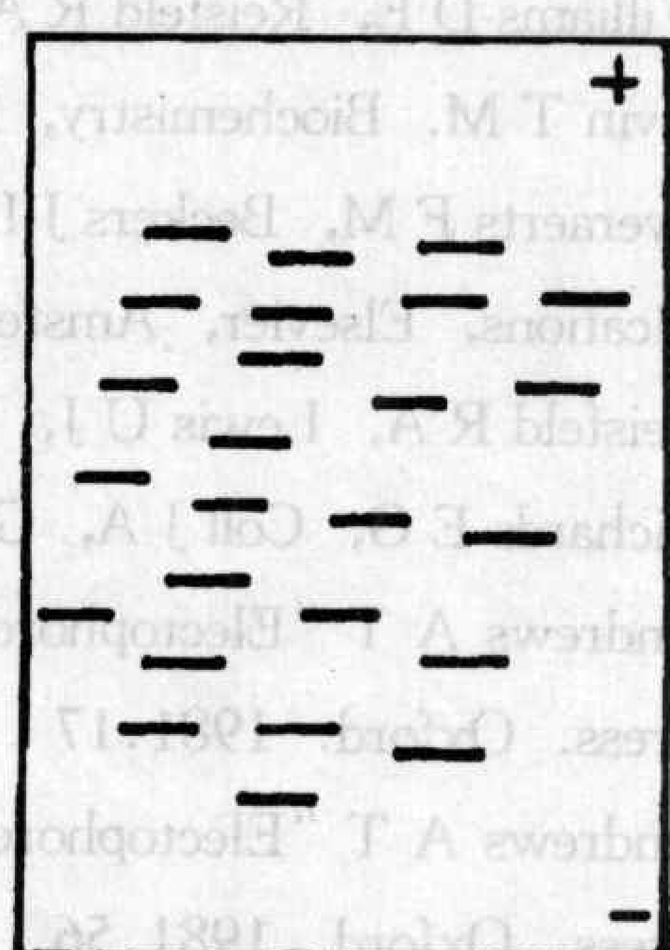


图4.18　蛋白带偏斜

蛋白带偏斜，见图4.18，常常是由于缓冲液滤纸条（或缓冲凝胶条）或电极放置不平行引起的或由于加样位置偏斜而引起。

蛋白带过宽，与邻近蛋白泳道的蛋白带相连是由于加样量太多或加样孔泄漏引起的。

蛋白带模糊不清和分辨不佳也是多种原因引起的。虽然梯度凝胶可以提高分辨率，但与其他方法相比，常规聚丙烯酰胺凝胶电泳是分辨率较低的方法。为了提高分辨率，不要加过多的样品，小体积样品可给出窄带。加样后应立即电泳，电泳后应立即固定，以防止扩散。选择合适的凝胶浓度，使组分得以充分的分离。通常靠近染料前沿的蛋白带分辨率不佳，所以应根据分子质量与凝胶孔径的关系，灌制足够长度的凝胶，以使样品不会走出前沿。

样品的蛋白水解作用也引起扩散而使分辨率降低。水解作用通常发生在样品准备的时候。系统中的内源性蛋白酶会水解样品蛋白，如果在缓冲液中加蛋白酶

抑制剂可以减少这种情况的发生。

参考文献

[1] Raymond S, Weintraub. Science, 1959 (130): 711

[2] Hjertén S. J. Chromatog., 1963 (11): 66

[3] Ornstein L. Ann. N. Y. Acad. Sci., 1964 (121): 321

[4] Davis B J. Ann. N. Y. Acad. Sci., 1964 (121): 404

[5] Gabriel O, Gersten D G. Anal. Biochem., 1992 (203): 1~21

[6] Lambin P. Anal. Biochem., 1979 (98): 160~168

[7] Rothe G M, Purkhanbaba H. Electropboresis. 1982 (3): 33~42

[8] Francis Jr R T, Davie J R, Sayre M, Rocha E. J. Chrom., 1984 (298): 115~121

[9] Righetti P G, Tudor G, Ek K. J. Chromatogr., 1981 (220): 115~194

[10] 郭尧君，俞添. 生物化学与生物物理学进展，1996 (4): 359~364

[11] Users Manual of Multiphor Ⅱ Electrophoresis System, Pharmacia Lk B Biotechnology AB Uppsala, Sweden, 1992. 161~171

[12] Williams D E, Reisfeld R A. Ann. N. Y. Acad. Sci., 1964 (121): 373

[13] Jovin T M. Biochemistry, 1973 (12): 871, 879, 890

[14] Everaerts F M, Beckers J L, Verheggen Th P E M. Isotachophoresis. Theory, Instrumentation and Applications, Elsevier, Amsterdam-Oxford-New York. J. Chromatogr. Library 1976 Vol. 6

[15] Reisfeld R A, Lewis U J, Williams D E. Nature, 1962 (195): 281

[16] Richards E G, Coll J A, Gratzer W B. Anal. Biochem., 1965 (12): 452

[17] Andrews A T "Electophoresis: theory, techniques, and biochemical and clinical applications" Clarendon Press. Oxford. 1981.17

[18] Andrews A T "Electophoresis: theory, techniques, and biochemical and clinical applications" Clarendon Press. Oxford. 1981.56

[19] Ferguson K A, Metabolism 1964 (13): 985

[20] Hedrick J L, Smith A J. Arch. Biochem. Biophys., 1968 (126): 155

[21] "Acrylamide Gel Casting handbook" Pharmacia Biotech AB Uppsala. sweden 1994.28

[22] Hames B D, Rickwood D., Gel Electrophoresis of Protain: a Practial approach. Second Edition IRL Press. Oxford. 1990.9~13

[23] Rodbari D, Chrambach A. Anal. Biochem., 1971 (40): 95

[24] Thorun W, Maurer H R., In Disc electrophoresis and related techniques of polyacrylamide gel electropohoresis (ed. H. R. Maurer) (2nd ed), Walter de Gruyter, Berlin, New York. 1971.4

[25] Bryan J K, Anal. Biochem., 1977 (78): 513

[26] Gonenne. A, Lebowitz J. Anal. Biochem. 1975. (64): 414

[27] Rodbard D, Chrambach A. Proc. Natl Acad. Sci. U. S. A. 1970 (65): 970

[28] Rodbard D. Chrambach A. In Electrophoresis and isoelectric focusing in polyacrylamide gel (eds. R. C. Allen and H. R. Maurer), Walter de Gruyter, Berlin, New York. 1974, 28

[29] Alder S P, Purich P, Stadtman, E R. J. Biol. Chem., 1975 (250): 6264

[30] Westermeier R. "Electrophoresis in Practice" VCH Weinheim, 1993.16

[31] "Horizontal SDS electrophoresis in 0.5 mm thin pore gradient gel" Application Note 348. Pharmacia LKB Biotechnology AB Uppsala. Sweden. 1991

[32] Pastewka J V, Ness A T, Peacock A C. Clin. Chim. Acta., 1966 (14): 219
[33] Strickland R, Podleski T R, Gurule F T, Freeman M L, Childs W A. Anal. Chem., 1959 (31): 1408
[34] McMaster-Kaye R, Kaye J S. Anal. Biochem., 1974 (61): 120
[35] Fishbein W N. Anal. Biochem., 1972 (46): 388
[36] Davis R H, Copenhaver J H, Carver M J. Anal. Biochem., 1974 (58): 615
[37] Racusen D. Anal. Biochem., 1973 (52): 96
[38] Fazekas de St. Groth S, Webster, R G, Datyner A. Biochim. Biophys. Acta (Amst.) 1963 (71): 377
[39] Meyer T S, Lamberts B L. Biochim. Biophys. Acta (Amst.) 1965 (107): 144
[40] Hames B D. Rickwood D, "Gel Electrophoresis of protein: a practial approach". Second Edition. IRL Press oxford. 1990. 53
[41] Ö Gaál, G A Medgyesi, L Verezkey. "Electrophoresis in the Seperation of Biological Macromolecules". A wiley-Interscience Publication, 1980.252
[42] Righetti P G. In Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology., North-Holland, Amsterdam. 1983. Vol. 11, 148
[43] Users Manual of Multiphor Ⅱ Electrophoresis System Pharmawa LKB Biotechnology AB Uppsala. Sweden. 1992.162, 165
[44] 郭尧君，生物化学与生物物理进展，1991 (1)：32～37
[45] Sreeramulu G, Singh N K, Electrophoresis, 1995 (3) 362～365
[46] Steck G, Leuthard, Bürk, R R, Anal. Biochem., 1980 (107): 21～24
[47] Blakesley, R W, BOEZI, J A, Analytical Biochemistry, 1977 (82): 580～582
[48] Vesterberg O, Hansén L, Sjösten A. Biochimica et Biophysica Acta. 1977 (491): 160～166
[49] Diezel W, Kopperschläger G, Hofmann E. Anal. Biochem., 1972 (48): 617
[50] Chrambach A, Reisfeld R A, Wyckoff M, Zaccari J. Anal. Biochem., 1967 (20): 150
[51] Reisner A. H, Nemes P, Bucholtz C. Anal. Biochem., 1975 (64): 509
[52] Wilson C M. In Methods in Enzymology. Academic Press, New York. 1983. Vol. 91, 236
[53] Blakesley R W, Boezi J A, Anal. Biochem., 1977 (82): 580～582
[54] Righetti P G, Chillemi F. J. Chromatogr. 1978 (157): 243～251
[55] Westermeier R. Electrophoresis in Practice. A Guide to Theory and Practice. VCH press. Weinheim. 1993.142
[56] Guo Y J, Bishop R, Ferhnström H et al. Cereal Chem., 1986 (63): 1～3
[57] Switzer R C, Merril C R, Shifrin S. Anal. Biochem., 1979 (98): 231
[58] Merril C R, Switzer R C, Van Keuren M L. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1979 (76): 4335～4339
[59] Oakley B R, Kirsch D R, Morris N R. Anal. Biochem., 1980 (105): 361
[60] Dunn M J, Burghes H M. Electrophoresis, 1983 (4): 173
[61] Merril C R, Goldman D, Van Keuren M L. In Methods in Enzymology. Academic Press, New York. 1984. Vol. 104, 441
[62] Ohsawa K, Ebata N. Anal. Biochem., 1983 (98): 231
[63] Merril C R. In Electrophoresis. VCH 1986. 273. Verlagsgesellschaft mbH
[64] Sammons D W, Adams L D, Nishizawa E E. Electrophoresis, 1981 (2): 135
[65] Morrissey J H. Anal. Biochem., 1981 (117): 307
[66] Confavreux C, Gianazza E, Chazot G Lasne Y, Arnaud P. Electrophoresis, 1982 (3): 206
[67] Wray W, Bonlikas T, Wray V P, Hancock R. Anal. Biochem., 1981 (118): 197

[68] Goldman D, Merril C R, Ebert M H. Clin. Chem., 1980 (26): 1317
[69] Dunbar B S. Two Dimensional Gel Electrophoresis and Immunological Techniques. Plenum Press, New York. 1987
[70] Berson G. Anal. Biochem., 1983 (134): 230
[71] Blum H, Beier H, Gross H J. Electrophoresis, 1987 (8): 93~99
[72] Granzier H L M, Wang K. Electrophoresis, 1993 (14): 56~64
[73] Kirkeby S, Moe D, Bϕ g-Hansen T C, Electrophoresis, 1993 (14): 51~55
[74] Heukeshoven J, Dernick R, Electrophoresis, 1985 (6): 103
[75] Heukeshoven J. Dernick R, Electrophoresis, 1986 (1): 22
[76] Swain M, Ross N W. Electrophoresis, 1995. (16): 948~951
[77] Rabilloud T, Girardot V, Lawrence J J, Electrophoresis, 1996 (17): 67~73
[78] Krause I, Elbertzhagen H. In: Radola BJ, Ed. Electrophorese-Forum'87. 1987.382~384
[79] Lee J W. Biochim. Biophys. Acta (Amst.) 1963 (69): 159
[80] Coulson C B, Sim A K. J. Biochem., 1961 (80): 46
[81] Aragancillo C, Rodriguez-Loperema, M A, Carbonero P, Garcia-Olmedo F. Anal. Biochem., 1975 (63): 603
[82] Cousden R, Kohn J. Nature. 1959 183: 1512
[83] Gorovsky M A, Carlson K, Rosenbaum J L. Anal. Biochem., 1970 (35): 359
[84] Gilmore LB, Hook G E R, J. Biochem. Biophys. method, 1981 (5) 57~66
[85] Allen R E, Masak K C, McAllister P K. Anal. Biochem., 1980 (104): 494
[86] Dahlberg A E, Dingman C W, Peacock A C. J. Mol. Biol., 1969 (41): 139
[87] Schyns R. J. Chromatogr, 1969 (44): 207
[88] Greenfield S, Norton N T, Morell P. J. Neurochem. 1971 (18): 2119
[89] Morell P, Greenfield S, Costantino-Ceccarini E, Wisniewski, H. J. Neurochem. 1972 (19): 2545
[90] Maurer H R. 1971 "Disc Electrophoresis and Related Techniques of Polyamylamide Gel Electrophoresis," Walter de Gruyter, Berlin-New. York, 76
[91] Zaccharius R M, Zell T E, Morrison J H, Woodlock J J. Anal. Biochem., 1969 (30): 148
[92] Mathieu J M, Quarles R H. Anal. Biochem., 1973 (55): 313
[93] Wardi A H, Allen W S. Anal. Biochem., 1972 (48): 621
[94] Eckhardt A E, Hayes C E, Goldstein I J. Anal. Biochem., 1976 (73): 192
[95] Funderburgh J L. Chandler J W. Anal. Biochem., 1978 (91): 462
[96] Wardi A H, Michos G A. Anal. Biochem., 1972 (49): 607
[97] Furlan M, Perret B A, Beck E A. Anal. Biochem., 1979 (96): 208
[98] Cotrufo R, Monsurro M R, Delfino G, Geraci G. Anal. Biochem., 1983 (134): 313
[99] Gander J E. In Methods in Enzymology, (ed. W. B. Jakoby), Academic Press, New York. 1984 Vol. 104, 447
[100] Rauchsen D. Anal. Biochem., 1979) (99): 474
[101] Gander J E. In Methods in Enzymology. Academic Press. New York. 1984. Vol. 104, 447
[102] Carson S D. Anal. Biochem., 1977 (78): 428
[103] Dupuis G, Doucet J P. Biochim. Biophys. Acta., 1981 (669): 171
[104] Gershoni J M, Palade G. Anal. Biochem., 1982 (124): 396
[105] Kock G L E, Smith M J. Eur. J. Biochem., 1982, (128): 107
[106] Taylor T, Weintraub B D. Endocrinology, 1985 (116): 1968

[107] Bradshaw J P, White P A. Biosci. Rep., 1985 (5): 229
[108] Avigad G. Anal. Biochem., 1978 (86): 443
[109] Moroi M, Jung S M. Biochem. Biophys. Acta., 1984 (798): 295
[110] Wallenfels B. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1979 (76): 3223
[111] Dubray G, Bezard G, Anal. Biochem., 1982 (119): 325
[112] Jackson P. in Advances in Electrophoresis, 1994, Vol. 7. 227～257
[113] Jackson P, Electrophoresis, 1994: (15): 896～902
[114] Green M R, Pastewka J V, Peacock A C. Anal. Biochem., 1973 (56): 43
[115] Cutting J A. In Methods in Enzymology, Academic Press. New York. 1984 Vol. 104, 451
[116] Debruyne I. Anal. Biochem., 1983 (133): 110
[117] Satoh K, Busch H, Cell Biol. Int. Rep., 1981 (5): 857
[118] Cantor L, Lamy F, Lecoca R. E. Anal. Biochem., 1987 (160): 414
[119] Hagenauer J, Ripley L, Nace G, Anal. Biochem., 1977 (78): 308
[120] Prat J P, Lamy J N, Weill J D. Bull. Soc. Chim. Biol., 1969 (51): 1367
[121] Tsai, C M, Frasch C E, Anal. Biochem., 1982 (119): 115
[122] Smejkal G B, Hoff H F, Electrophoresis, 1994 (15): 922～925
[123] Clarke J T, Ann N Y. Acad. Sci., 1964 (121): 428
[124] Uriel J, Chuilon S. In Methods in Immunology and Immunochemistry. Academic Press. New York-London. 1965. Vol. 3, 304
[125] Linder-Horowitz M, Ruettinger R T, Munro H N. Biochim. Biophys. Acta., (Amst.) 1970 (200): 442
[126] 郭尧君，方勇，李晓斌. 生物物理学报，1998 (14): 585～588
[127] "Polyacrylamide gel electrophoresis lab. techniques" Pharmacia AB. Uppsala, Sweden, 1986.55
[128] Uriel J, Gotz H, Grabar P. J. Med. Suisse 87. Suppl., 1957 (14): 258
[129] Reed D W, Passon P G, Hultquist D E. J. Biol. Chem., 1970 (245): 2954
[130] Moens L, Burford G D. Anal. Biochem., 1973 (51): 466
[131] Fritz P J, Morrison W J, White E L, Vesell F S. Anal. Biochem., 1970 (36): 443
[132] Cremer Th, Dames W, Neuhoff V, Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem., 1972 (353): 1317
[133] Shaw C R., Prasad R. Biochem. Genet., 1910 (4): 297
[134] Harris H, Hopkinson D A. Handbook of Enzyme Electrophoresis in Human Genetics. North-Holland, Amsterdam. 1976
[135] Rothe G M, Maurer W D. In Gel Electrophoresis of Proteins, Wright, Bristol. 1986 . 37～140
[136] Heeb M J, Gabriel O. In Methods in Enzymology, Academic Press, New York. 1984. Vol. 104, 416
[137] Gaál Ö, Medgyesi G A, Vereczkey L, "Electrophoresis in the Separation of Biological Macromolecules" A Wiley-Intersciences Publication. 1980, 265～285
[138] Hames B D, Rickwood D. "Gel Electrophoresis of proteins: a practical approach. Second Edition in Appendix 2, 1990. 334～345
[139] 林桂莲，郭尧君等. 中国农业科学，1987 (1): 20
[140] 周厚安，郭尧君等. 动物学集刊，1985 (3): 14～21
[141] 阎一林，郭尧君，钦俊德. 昆虫学报，1987 (30): 341～345
[142] Guo Y J, Huang L L, Yao X G et al. Electrophoresis, 1996 (17): 535～536
[143] Vargić T, Mrša V. Electrophoresis. 1994, (15): 903～906
[144] Kalix S, Buchenauer H. Electrophoresis, 1995 (16): 1016～1018

[145] Menteur S, Jestin L, Risacher T, Branlard G. Electrophoresis, 1995 (16): 1019~1023
[146] Santos F, Amorim A, Kömpf J. Electrophoresis, 1995 (16): 1898~1899
[147] Peyronel D V, Cantera A M B. Electrophoresis, 1995 (16): 1894~1897
[148] King B J, Lee L S, Rackemann R G, Scott P T. Electrophoresis, 1995 (16): 32~38
[149] Alonso J, Rodriguez M T, Canet W. Electrophoresis, 1995 (16): 39~42
[150] Karssen G, Hoenselaar T V, Bakker B V, Janssen R. Electrophoresis, 1995 (16): 105~109
[151] Nadano D, Suda T Y, Sawazaki K, Takeshita H, Kishi K, Electrophoresis, 1996 (17): 104~109
[152] Randeniya F U, Savidge R, Electrophoresis, 1994 (15): 1072~1077
[153] Aledo J C, Biedma S G, Segura J A, Molina M et al. Electrophoresis, 1993 (14): 88~93
[154] Schetters H, McLeod B. Anal. Biochem., 1979 (98): 329
[155] Tjissen P, Kurstak E. Anal. Biochem., 1979 (99): 97
[156] Eng P R, Parker C O. Anal. Biochem., 1974 (59): 323
[157] Douglas S A, La Marca M E, Mets L J. In Electrophoresis'78, Elsevier/North-Holland, Amsterdam. 1978, Vol. 2, 155
[158] Ragland W L, Benton T L, Pace J L, Beach F G, Wade A E. In Electrophoresis'78, Elsevier/North-Holland, Amsterdam. 1978. Vol. 2, 217
[159] Ragland W L, Pace J L, Kemper D L. Anal Biochem., 1974 (59): 24
[160] Ragland, W L et al. In Electrophoresis '78, Elsevier/North-Holland, Amsterdam. 1978. Vol. 2, 155
[161] Barger B O, White F C, Pace J L, Kemper D L, Ragland W L. Anal. Biochem., 1976 (70): 327
[162] Yamamoto K, Okamoto Y, Sekine T. Anal. Biochem., 1978 (84): 313
[163] Weidekamm E, Wallach D F H, Flückiger R. Anal. Biochem., 1973 (54): 102
[164] Liebowitz M J, Wang R W. Anal. Biochem., 1984 (137): 161.
[165] Andrews A T. Electrophoresis: Theory, Techniques and Biochemical and Clinical Applications, Clarendon press, Oxford, 1986, 29.
[166] Jackowski G, Liew C C. Anal. Biochem., 1980 (102): 34
[167] Hartman B K, Udenfriend S. Anal. Biochem., 1969 (30): 391
[168] Harowitz P M, Bowman S. Anal. Biochem., 1987 (165): 430
[169] Olden K, Yamada K M. Anal. Biochem., 1977 (78): 483
[170] Showe M K, Isobe E, Onorato L. J. Mol. Biol., 1976 (107): 55
[171] Saltzgaber-Müller J, Schatz G. J. Biol. Chem., 1978 (253): 305
[172] Flesch B, Ntambi E, Neppert J. Electrophoresis, 1995 (16): 757~762
[173] Kido A, Kimura Y, Oya M. Electrophoresis, 1995 (16): 1024~1026
[174] Suen K K Y, Lewis W H P. Electrophoresis, 1994 (15): 1120~1124
[175] Guo Y J, Li X H, Huang L L. Electrophoresis, 1996 (17): 537~539
[176] Arnaud P, Wilson G B, Koistinen J, Fudenberg H U J. Immuno. Methods, 1977 (16): 221~231
[177] Marshall M O. Clinica Chimica Acta, 1980 (104): 1~9
[178] Huston L L. Anal. Biochem., 1971 (44): 81
[179] Kyte J J. Biol. Chem., 1971 (246): 4157
[180] Andrews A T. Electrophoresis: Theory, Techniques and Biochemical and Clinical Applications. Second Edition. Oxford University Press. New York. 1986
[181] 郭尧君. 生物工程进展, 1994 (14): 59~61
[182] 郭尧君. 生物化学与生物物理进展, 1983 (3): 50~55
[183] 郭尧君, 曹泳清, 文镜. 生殖与避孕, 1985 (5): 17~22

[184] Rabilloud T, Vincon M Garin J. Electrophoresis, 1995 (16): 1414
[185] Rabilloud T. Electrophoresis, 1996 (17): 813
[186] Lyubimova T, Caglio S, Gelfi C et al. Electrophoresis, 1993 (14): 40
[187] Lyubimova T, Righetti P G. Electrophoresis, 1993 (14): 191
[188] Righetti P G, Bossi A, Giglio M et al. Electrophoresis, 1994 (15): 1005
[189] 郭尧君，李辛晖，黄力力，喻忠义．生物化学与生物物理进展，1995 (22): 559～562
[190] 郭尧君．生物化学与生物物理进展，1993 (20): 265～266
[191] Guo Y J, Li X H, Fang Y. Electrophoresis, 1998 (19): 1311～1313

第 5 章　SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳

十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳（sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis，SDS-PAGE），简称 SDS 电泳。它是根据 SDS 和还原试剂将蛋白质分子解聚后亚基的大小，在恒定 pH（碱性）缓冲系统中的分离。主要用于测定蛋白质亚基分子质量。与光散射、渗透压、超速离心（蔗糖密度梯度离心，沉降平衡技术）及层析方法（凝胶过滤）相比，它不需要昂贵的仪器设备，操作简便，能在几小时内得到结果，有较高的重复性，且不需要非常纯的样品（取决于样品的组成和对结果的要求），是目前为大家所接受的用于测定亚基分子质量的一种最好方法。这个方法可用于多肽分子质量的分析，用于变性蛋白的分离以及仅仅溶解在离子去污剂中的膜蛋白和用层析方法分离的蛋白和酶的纯化控制。在临床实验室，尿蛋白的 SDS 电泳分析已被公认是肾脏疾疾诊断的有用工具。

5.1　原　　理

5.1.1　蛋白质分子的解聚

SDS 电泳技术首先在 1967 年由 Shapiro 等[1]建立，1969 年由 Weber 和 Osborn[2]进一步完善。他们发现在样品介质和聚丙烯酰胺凝胶中加入离子去污剂和强还原剂后，蛋白质亚基的电泳迁移率主要取决于亚基分子质量的大小，而电荷因素可以被忽略。

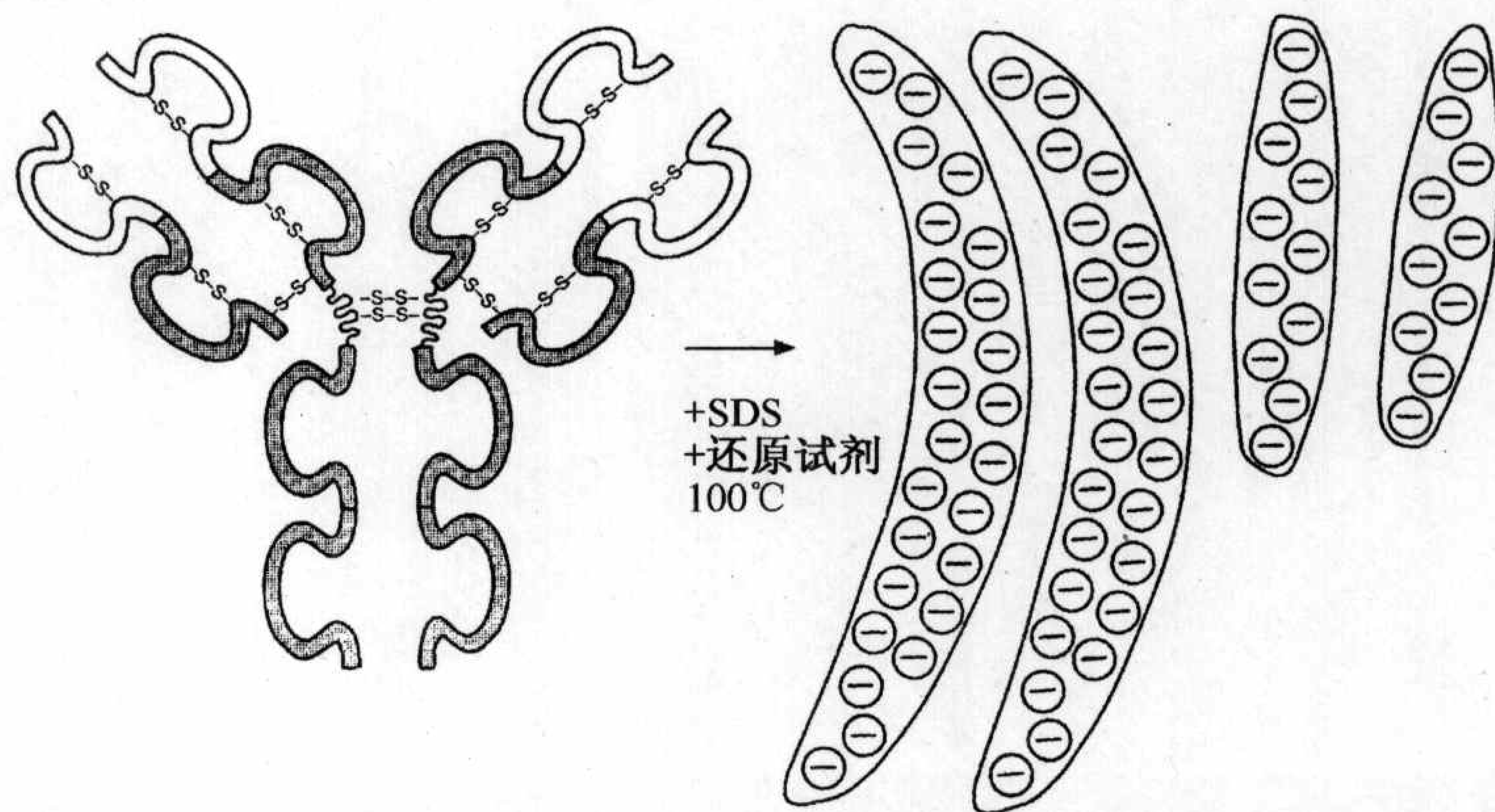


图 5.1　蛋白质样品在 100℃用 SDS 和还原试剂处理 3～5 分钟后解聚成亚基[3]

SDS是一种阴离子去污剂，作为变性剂和助溶性试剂，它能断裂分子内和分子间的氢键，使分子去折叠，破坏蛋白质分子的二级和三级结构。强还原剂，例如β-巯基乙醇（β-mercapto ethanal）和二硫苏糖醇（dithiothreitol，DTT）则能使半胱氨酸残基之间的二硫键断裂。在样品和凝胶中加入SDS和还原剂后，在100℃保温3～5分钟，分子被解聚为组成它们的多肽链。解聚后的氨基酸侧链与SDS充分结合形成带负电荷的蛋白质-SDS胶束（protein-SDS micelles），所带的负电荷大大超过了蛋白质分子原有的电荷量，这就消除了不同分子之间原有的电荷差异。蛋白质-SDS胶束在水溶液中的形状像一个长椭圆棒，见图5.1。椭圆棒的短轴对不同的蛋白质亚基-SDS胶束基本上是相同的，约为18 Å。但长轴的长度则与亚基分子质量的大小成正比。因此这种胶束在SDS-聚丙烯酰胺凝胶系

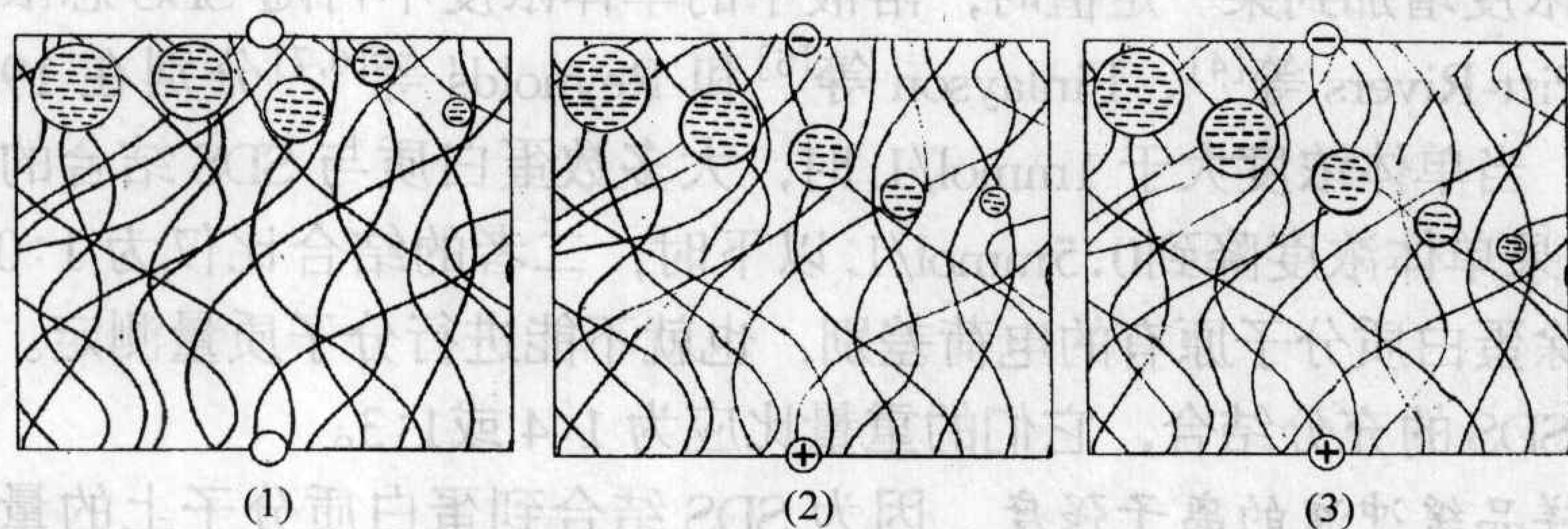


图5.2　SDS连续电泳

（1）加样；（2）加电场，分子开始迁移；（3）电泳结束

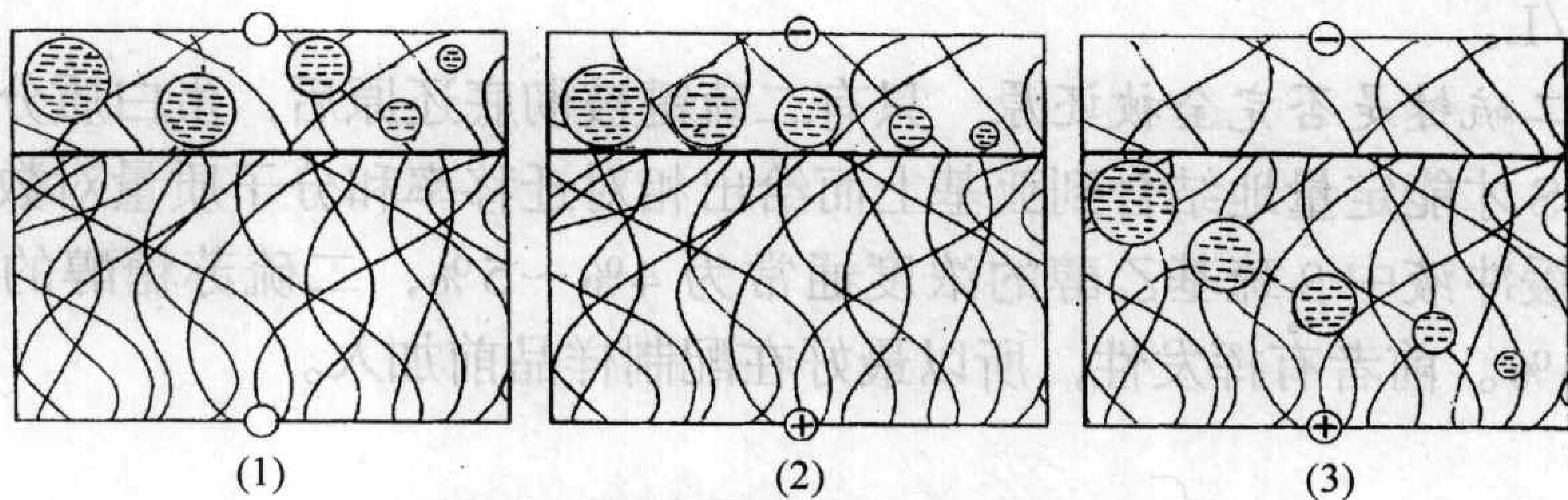


图5.3　SDS不连续电泳（分离胶为均匀胶）

（1）加样；（2）加电场，样品浓缩在界面上；（3）电泳结束

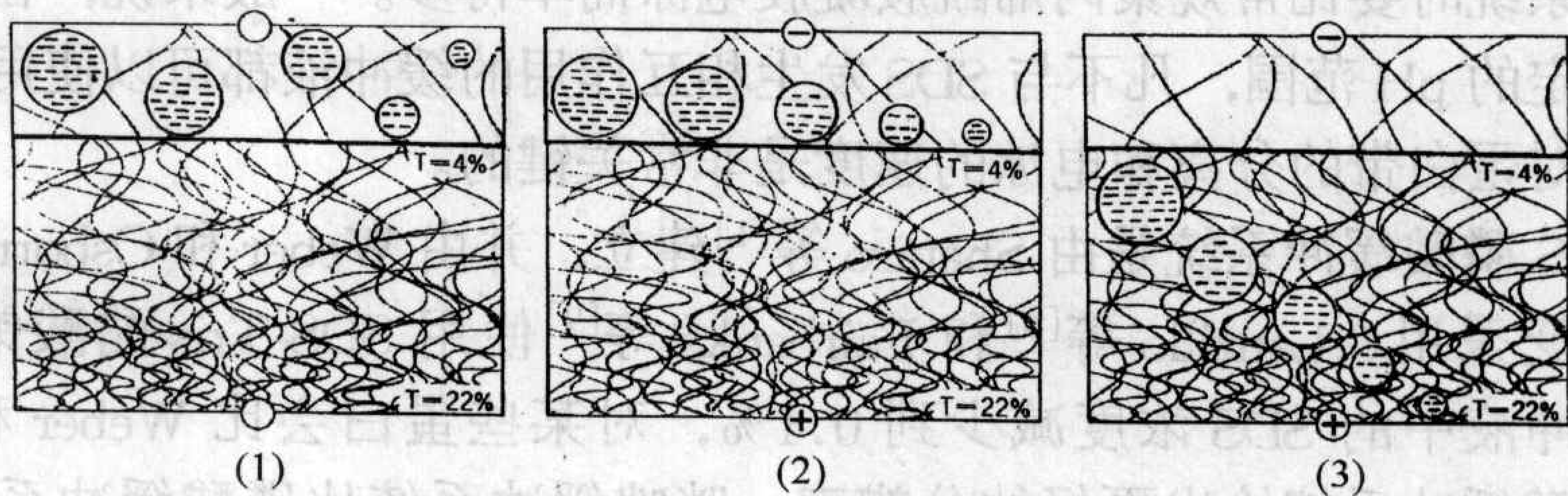


图5.4　SDS不连续电泳（分离胶为梯度胶）

（1）加样；（2）加电场，样品浓缩在界面上；（3）电泳结束

统中的电泳迁移率不再受蛋白质原有电荷的影响，而主要取决于椭圆棒的长轴长度，即蛋白质或亚基分子质量的大小。当蛋白质亚基的分子质量在 15kDa 到 200kDa 之间时，电泳迁移率与分子质量的对数呈线性关系。由此可见，SDS 电泳不仅可以分离蛋白质，而且可以根据迁移率大小测定蛋白质亚基的分子质量。见图 5.2、5.3 和 5.4 这个规律对大部分蛋白质是适用的，只有少数蛋白质例外。

SDS 电泳的成功关键之一是电泳过程中，特别是样品制备过程中蛋白质与 SDS 的结合程度。影响它们结合的因素主要有三个。

(1) *溶液中 SDS 单体的浓度* SDS 在水溶液中是以单体和 SDS-多肽胶束 (SDS-polypeptide micelles) 的混合形式存在的，能与蛋白质分子结合的是单体。单体的浓度与 SDS 总浓度，温度和离子强度有关。在一定温度和离子强度下，当 SDS 总浓度增加到某一定值时，溶液中的单体浓度不再随 SDS 总浓度的增加而升高。Pitt-Rivers 等[4]、Finlayson 等[5]和 Reynolds 等[6,7]分别在 1968～1971 年间指出，当单体浓度大于 1mmol/L 时，大多数蛋白质与 SDS 结合的重量比为 1∶1.4。如果单体浓度降到0.5mmol/L 以下时，二者的结合比仅为 1∶0.4。这样就不能消除蛋白质分子原有的电荷差别，也就不能进行分子质量测定。为了保证蛋白质与 SDS 的充分结合，它们的重量比应为 1∶4 或1∶3。

(2) *样品缓冲液的离子强度* 因为 SDS 结合到蛋白质分子上的量仅决定于平衡时 SDS 的单体浓度，不是总浓度，而只在低离子强度的溶液中，SDS 单体才具有较高的平衡浓度。所以 SDS 电泳的样品缓冲液离子强度较低，常为 10～100 mmol/L。

(3) *二硫键是否完全被还原* 只有二硫键被彻底还原后，蛋白质分子才能被解聚，SDS 才能定量地结合到亚基上而给出相对迁移率和分子质量对数的线性关系。样品缓冲液中 β-巯基乙醇的浓度通常为 4%～5%，二硫苏糖醇的浓度通常为 2%～3%。前者有挥发性，所以最好在配制样品前加入。

5.1.2 缓冲系统的选择

由于 SDS 对蛋白质的溶解性能以及负电荷的包裹作用，所以在选择 SDS 电泳缓冲系统时要比常规聚丙烯酰胺凝胶电泳简单得多。一般来说，在被分析的蛋白质稳定的 pH 范围，凡不与 SDS 发生相互作用的缓冲液都可以使用，但缓冲液的选择对蛋白带的分离和电泳的速度是非常关键的。

SDS-磷酸缓冲系统是由 Shapiro 等[1]建立，并由 Weber 和 Osborn[2]改进，现已被广泛采用。Lanzillo 等[8]和 Fairbanks 等[9]使用 SDS-Tris-醋酸钠缓冲系统，可将缓冲液中的 SDS 浓度减少到 0.1%，对某些蛋白会比 Weber 和 Osborn 的 SDS-磷酸缓冲系统给出更好的分辨率。咪唑缓冲系统比磷酸缓冲系统的导电性低，所以电泳速度要比后者快一倍。对分子质量低于 15kDa 的蛋白样品，为了

提高分辨率最好使用 SDS-尿素系统[10]。

含有 SDS 的不连续缓冲系统现在被广泛地用于蛋白质亚基分子质量以及纯度的测定。其中 LaemmLi 的 Tris-甘氨酸系统[11]是目前使用最多的缓冲系统。它是直接基于 Ornstein[12]和 Davis[13]在常规聚丙烯酰凝胶电泳中所用的缓冲系统。如果用 SDS 电泳纯化蛋白的目的是为了测定氨基酸组成或氨基酸序列，则应该用硼酸盐代替甘氨酸，以减少由甘氨酸产生的背景[14]。使用 Tris-硼酸盐缓冲系统还能测定糖蛋白的分子质量[15]。

在 SDS 电泳系统中需要使用样品缓冲液，凝胶缓冲液以及电极缓冲液[16]。在连续电泳中常使用相同的缓冲系统，只是离子强度不同。在不连续电泳中，样品缓冲液和凝胶缓冲液常采用同一种系统，只是 pH 和离子强度不同。根据蛋白质与 SDS 结合的原理，常采用低离子强度，特别是样品缓冲液，它的离子强度通常为凝胶缓冲液的十分之一，但 SDS 的含量应高于凝胶缓冲液。电极缓冲液可以采用与上述相同或不同的缓冲系统，它主要影响电泳的速度[16]。

5.1.3 凝胶浓度的选择

由于 SDS 电泳分离并不取决于蛋白质的电荷密度，只取决于分子解聚后 SDS-蛋白质胶束的大小，因此凝胶浓度的正确选择尤为重要。如果凝胶浓度太大，孔径太小，电泳时容易产生拖尾，甚至样品分子不能进入凝胶。如果凝胶浓度太小，孔径太大，则样品中各种蛋白质分子均随着缓冲液流向前推进而不能得以很好地分离而降低分辨率。不同分子质量范围的蛋白质应选用不同的凝胶浓度[3,16]，参见表 5.1。

表 5.1 凝胶浓度与分子质量测定的关系[3,16]

凝胶浓度 T（$C=2.6\%$）	分子质量范围（kDa）	凝胶浓度 T（$C=5\%$）	分子质量范围（kDa）
5	25～200	5	60～170
10	10～70	10	20～100
15	＜50	15	10～50
20	＜40	20	5～40

对于具有不同迁移率的多组分样品，很难选择一种浓度的凝胶来分离，此时最好使用梯度胶，使感兴趣的组分正好走在凝胶的中间位置。梯度胶浓度范围的选择主要根据样品的特性：样品的分子质量范围，样品组分电泳带的相对位置，感兴趣组分的分子质量等。根据这些因子选择梯度形式（线性梯度或指数梯度）和浓度梯度范围，充分利用分子筛效应提高分辨率。实际上，由于操作的问题，凝胶浓度低于 3%或高于 25%都不能被使用。用不连续电泳的浓缩胶和分离胶（梯度胶）的分子筛效应提高分辨率的原理请参阅 2.4 节和 4.1.4 节。

1980年Görg等[17,18]介绍了薄层聚丙烯酰胺小孔梯度凝胶SDS电泳，不仅提高了分辨率，而且缩短了电泳时间。这种方法被成功地用于植物蛋白[19,20]和尿蛋白的常规临床分析[21~23]。

对分子质量小于15kDa的样品不但应该使用SDS-尿素系统，还应使用高交联度凝胶[10]。

5.1.4 分子质量测定

5.1.4.1 分子质量测定的理论背景

使用聚丙烯酰胺凝胶电泳进行分子质量的测定有两种方法。一种方法是如4.1.6节所述的数学方法，即测量蛋白质分子在不同浓度凝胶中的相对迁移率来排除电荷因素的影响，即Ferguson作图法[24]：

$$\lg m = \lg m_0 - K_R T$$

$$\lg R_f = \lg r_0 - K_R T$$

这里 m 和 R_f 是聚丙烯酰胺浓度为 T%时的迁移率和相对迁移率。m_0 和 Y_0 是假设当凝胶浓度 T 为0%时的自由迁移率和自由相对迁移率。直线的斜率为阻滞系数 K_R（reterdation koefficient）。K_R 与凝胶系统的交联度，分子的形状和分子质量有关。

另一种方法是用带有相当大量电荷的基团（如SDS）结合到蛋白质分子上，以克服蛋白质分子原有电荷的影响而得到恒定的荷/质比。在SDS电泳系统中，Y_0 几乎是一个恒定值[1,2]，因此在任何凝胶浓度时，R_f 和 K_R 之间都存在着线性关系。如果凝胶的交联度和SDS-多肽胶束的形状也是一个常数，则 R_f 就直接与分子质量有线性关系，并不需要测定样品在不同凝胶浓度时的相对迁移率，而选择合适的凝胶浓度只是为了得到SDS电泳的最佳分辨率。在SDS电泳中的这种相对迁移率和亚基分子质量对数的线性关系被很多实验所证实[7,25~27]，他们观察到分子质量在20～60kDa范围内的线性关系是良好的。Neville[28]也观察到分子质量只是在15kDa以下，70kDa以上时的线性关系有偏差。

5.1.4.2 蛋白标准

用SDS电泳技术测量未知蛋白质的分子质量时通常使用蛋白标准。所选择的蛋白标准的结构与特性应尽可能与未知蛋白质相近，分子质量范围应略高于和低于未知蛋白质的分子质量。蛋白质标准和未知样品必须用相同的方法制备，然后在分离或混合状态下一起电泳。它们在这两种状态下的相对迁移率应该是相同的。如有差别，则表示混合状态下可能有蛋白质的相互作用或者是由于过量加样。

Tracy等[29]的实验报道用两个已知分子质量的蛋白质标准来测得未知蛋白质

分子质量的标准误差为±3000Da。误差的主要来源是由于该方法是假定所有已知分子质量的蛋白质标准和未知蛋白质的 Y_0 是相同的；假定在有效分子直径和分子质量之间存在着恒定的关系；假定结合到蛋白质标准和未知蛋白质的 SDS 的量是相同的。为此，蛋白质分子必须被解聚，二硫键必须被还原。牛血清白蛋白和核糖核酸酶在未被还原时，每克蛋白质只结合 0.9g SDS，而只是在二硫键被还原后才结合 1.4g 蛋白质[4,7]。有时蛋白质的一级结构也显示异常行为而影响每克蛋白质对 SDS 的结合量，并且多肽链的内部电荷影响 SDS-蛋白质胶束的净电荷，此时 Y_0 明显地偏离平均值，如组蛋白的多肽链就具有异常高的正电荷而不能被结合的 SDS 的负电荷所覆盖。

有异常的氨基酸组成的蛋白质不宜作为蛋白质标准。如核糖核酸酶、脱氧核糖核酸酶、胰凝乳蛋白酶原、酪蛋白（α_{s1}、β 和 κ-酪蛋白）以及分子质量低于 15kDa 的蛋白。糖蛋白本身虽然在 R_f 和 K_R 之间存在着很好的线性关系[30]，但它的点偏离蛋白的标准曲线，这可能是由于 SDS 结合量的不同。所以糖蛋白不能用通常的标准曲线来求得其分子质量[30]。

选择蛋白标准的另一个途径是用化学方法交联多肽链以形成一系列多聚体作为不同分子质量的标准。Payne[31]用戊二醛（glutaraldehyde）制备了分子质量范围在 30～200kDa 的一系列可溶性的多聚体。原瑞典 LKB 公司有一种低分子质量标准是用不同多聚体的二乙焦碳酸盐（diethylpyro carbonate）组成的。

现在市售的蛋白标准大多是由一系列纯化的不同分子质量的蛋白质组成的，它们之间不会发生相互作用，且有良好的线性关系。如 GE 医疗集团，安玛西亚公司现有 4 种分子质量蛋白标准试剂盒，它们的分子质量范围分别为 2512～16 949Da，14 400～97 000Da 和 53 000～220 000Da 和 66 000～669 000Da，见表 5.2[32]。为了在电泳时即时观察蛋白分离情况，可采用着色的蛋白标准（称为“彩虹”蛋白标准）见表 5.3[33]。

表 5.2　SDS 电泳蛋白标准[32]

蛋白质	分子质量（Da）	来源	含量（μg）
多肽蛋白标准试剂盒（2512～16 949Da）			
马肌球蛋白多肽	16 949	马	
	14 404	马	
	10 700	马	
	8159	马	
	6214	马	
	2512	马	

续表

蛋白质	分子质量	来源	含量（μg）
高分子质量蛋白标准试剂盒（53 000～220 000Da）			
肌球朊	220 000	兔肌	25
α-2-巨噬球蛋白	170 000	牛血浆	100
β-半乳糖苷酶	116 000	*E. coil*	16
转铁蛋白	76 000	人	17
谷氨酸脱氢酶	53 000	牛肽	18
低分子质量蛋白标准试剂盒（14 000～97 000Da）			
磷酸化酶 b	97 000	兔肌	67
白蛋白	66 000	牛血清	83
卵白朊	45 000	鸡卵蛋白	147
碳酸酐酶	30 000	牛红血球	83
胰蛋白酶抑制剂	20 100	大豆	80
α-乳白朊	14 400	牛奶	116

表 5.3 SDS 电泳“彩虹”蛋白标准[33]

蛋白质	分子质量	来源	含量（μg）
全范围“彩虹”分子质量标准			
复合蛋白	250 000		75
	160 000		75
	105 000		75
	75 000		75
	50 000		75
	35 000		75
	30 000		75
	25 000		75
	15 000		75
	10 000		75
低分子质量“彩虹”蛋白标准			
卵白朊	45 000	鸡卵蛋白	250
碳酸酐酶	35 000	牛红血球	250
胰蛋白酶抑制剂	20 100	大豆	250
溶菌酶	14 300	鸡卵蛋白	250
Aprotinin	6500	牛肺	250
胰岛素 B 链	3500	牛胰	250
胰岛素 A 链	2500	牛胰	250
高分子质量“彩虹”蛋白标准			
肌球朊	220 000	兔肌	250
磷酸化酶 B	97 000	兔肌	250
白蛋白	66 000	牛血清	250
卵白朊	45 000	鸡卵蛋白	250
碳酸酐酶	30 000	牛红血球	250
胰蛋白酶抑制剂	20 100	大豆	250
溶菌酶	14 300	鸡卵蛋白	250

5.1.4.3 分子质量的计算

蛋白质的相对迁移率 R_f 是用每个带的迁移距离除以溴酚蓝前沿的迁移距离得到的。所有的测量位置应该在蛋白带的中央：

$$R_f = \frac{\text{蛋白带迁移距离}}{\text{溴酚蓝迁移距离}}$$

如果凝胶厚度大于 1mm，由于染色、脱色和保存过程中凝胶的肿胀或收缩，所以必须测量固定前和干燥后的凝胶的尺寸来消除误差：

$$R_f = \frac{\text{蛋白带迁移的距离}}{\text{干燥后的凝胶长度}} \times \frac{\text{固定前的凝胶长度}}{\text{溴酚蓝迁移距离}}$$

用每个蛋白标准的分子质量的对数（纵坐标）对它的相对迁移率（横坐标）作图就能得到一条直线。量出未知蛋白的迁移率便可测出其分子质量。这样的标准曲线只对同一块凝胶上的样品的分子质量测定才具有可靠性。现在使用凝胶扫描或影像文件处理系统便可很快地在屏幕上读得未知样品的分子质量。

5.1.5 低分子质量多肽的 SDS 电泳

分子质量低于 15kDa 的多肽在常规 Tris-甘氨酸–盐酸系统中电泳的分辨率是不够的。Schägger 等[34]使用浓缩胶，增加缓冲液的摩尔浓度，并且用三羟甲基氨基甘氨酸（tricine）代替甘氨酸作为终止离子（terminating ion），这样便可在 1～100kDa得到线性关系。分子质量小于 15kDa 的多肽在通常使用的 SDS 电泳条件下异常的原因是由于 SDS-多肽胶束大致是一个球形，而不是椭圆形。它们的长度和直径在同一个数量级[27]，同时由于较高的多肽内部的电荷不能被结合的 SDS 的电荷所覆盖，所以偏离了相对迁移率和分子质量对数的相互关系。

Swank 等[10]采用合适孔径的凝胶，即增加甲叉双丙烯酰胺的浓度以及在含有 SDS 的凝胶中加 8mol/L 的尿素，能使测定的分子质量值接近于预期值。对 11 个多肽的测定，精确度为 ±18%。Williams 等[35]的实验观察到分子质量小于 6000 的蛋白在 SDS 电泳的标准条件下都有相同的迁移率，与丙烯酰胺的浓度无关，而只在交联度 $C = 10\%$，并且加 8mol/L 尿素时才能得到较好的结果。

Lanzillo 等[36]发现在 LaemmLi 系统和仅在样品和电极缓冲液中有 SDS 的不连续缓冲系统中，低分子质量多肽常常堆积在浓缩胶中，甚至不能进入 7% 的分离胶，但它们能在小孔梯度凝胶或连续电泳时分离。这表明当样品通过浓缩胶和分离胶的界面时，终止离子的迁移率的增加不足以将蛋白分子带到分离胶中。

Kyte 等[37]发现由 25～250 个残基组成的多肽能用含有 8mol/L 尿素和 0.1% SDS 的 20% 的聚丙烯酰胺凝胶来分离。垂直电泳的上槽缓冲液，浓缩胶和分离胶的不连续缓冲系统是分别用消旋吡啶（mespyridine），氯化吡啶和 Tris-盐酸配制的。

5.2 方　　法

SDS电泳是测定蛋白质亚基分子质量的简单、快速和可靠的好方法。根据对样品的处理方式可分为还原SDS电泳（reducing SDS electrophoresis），非还原SDS电泳（non-reducing SDS electrophoresis）和带有烷基化作用的还原SDS电泳（reducing SDS treatment with alkylation）。根据缓冲系统和凝胶孔径的不同分为连续电泳和不连续电泳（包括梯度凝胶电泳）。根据电泳的形式分为圆盘电泳和平板电泳、后者又分为垂直电泳和水平电泳。本章将主要介绍平板电泳，特别是薄层水平小孔梯度SDS电泳的新方法。

SDS电泳和常规聚丙烯酰胺凝胶电泳一样，也需要三个步骤：制胶、电泳和检测。

5.2.1 制胶（用于垂直电泳或水平电泳）

SDS电泳的制胶方法与4.2.1.1节和4.2.1.2节所述的常规聚丙烯酰胺凝胶的灌注方法基本相同，只是在SDS电泳制胶时单体贮液不需要抽气，以免产生泡沫，且聚合后的凝胶在室温下，而不是在4℃放置过夜，这样既可使凝胶充分聚合，以提高电泳的分辨率，又防止SDS在凝胶中结晶。自制的SDS凝胶最多可在室温下保存4天。因为SDS的高pH会使丙烯酰胺水解。如果需要长期保存，最好选用pH6.7的Tris-醋酸缓冲液。

不管是垂直电泳，还是水平电泳，SDS连续电泳用的凝胶灌注方法十分简便，请参阅4.2.1节。表5.4为凝胶配方[38]，贮液配置如下：

（1）丙烯酰胺单体贮液

11.1g丙烯酰胺＋0.3g *N*, *N*′-甲叉双丙烯酰胺，先用35ml双蒸水溶解，搅拌，直到溶液变成透明，再用双蒸水稀释至50ml，过滤。用棕色瓶可在4℃保存一个月。两种丙烯酰胺单体及溶液是中枢神经毒物，要小心操作。

（2）磷酸缓冲液贮液（0.2 mol/L，pH7.1）

19.5g $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$＋129.0g $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$＋5g SDS，用双蒸水溶解到2.5L，检查pH。

（3）咪唑缓冲液贮液（0.1 mol/L，pH7.0）

17.0g咪唑＋5g SDS＋1.5 L双蒸水，用稀磷酸调至pH 7。用双蒸水稀释至2.5L，再检查pH。

（4）10％过硫酸铵

0.1g过硫酸铵＋1ml双蒸水。使用前新鲜配制。

表 5.4 SDS 连续电泳用的凝胶配方[38]

贮 液	凝胶终浓度（$C=2.6\%$）		
	$T=5.1\%$	$T=7.7\%$	$T=10.2\%$
单体贮液（ml）	5.3	6.7	9.0
缓冲液贮液（ml）	10.0	10.0	10.0
双蒸水（ml）	4.5	3.1	0.8
10%过硫酸铵（μl）	100	100	100
TEMED（μl）	100	100	100

注：①缓冲液贮液可用磷酸缓冲液，咪唑缓冲液或其他缓冲液。

②过硫酸铵应在即将灌胶前加。过硫酸铵和 TEMED 的量应根据室温或聚合情况而定。

③欲配制不同终浓度，不同厚度或不同大小的凝胶，可根据表中的体积按比例变化。

在不连续电泳系统中，LaemmLi[11]使用的 Tris-甘氨酸缓冲液仍然是现在通常使用的缓冲系统。表 5.5 为凝胶配方[38]，贮液配置如下：

（1）丙烯酰胺单体贮液

14.55g 丙烯酰胺 + 0.45g N，N′-甲叉双丙烯酰胺，先用 35ml 双蒸水溶解，搅拌，直到溶液变成透明，再用双蒸水稀释至 50ml，过滤。用棕色瓶可在 4℃保存一个月。两种单体和溶液都是中枢神经毒物，要小心操作。

（2）浓缩胶缓冲液贮液（1mol/L Tris-HCl，pH6.8）

6.06g Tris 溶解在 40ml 双蒸水中，用 4 mol/L 盐酸调节 pH 至 6.8，再用双蒸水加至 50ml。4℃保存。

（3）分离胶缓冲液贮液（1.5mol/L Tris-HCl，pH8.8）

9.08g Tris 溶解在 40ml 双蒸水中，用 4mol/L 盐酸调节 pH 至 8.8，再用双蒸水加至 50ml。4℃保存。

（4）10% SDS

25g SDS，用双蒸水溶解至 250 ml。室温保存。

（5）10%过硫酸铵

0.1g 过硫酸铵 + 1ml 双蒸水。使用前新鲜配制。

（6）10% TEMED

0.1 ml TEMED + 0.9ml 双蒸水

灌注垂直电泳用的凝胶必须按 4.2.1.1 节中所述的方法，先灌注分离胶，加保护层，聚合后再灌注浓缩胶，并插入合适的梳子。

表 5.5　SDS 不连续电泳用的凝胶配方（垂直电泳用）[38]

贮 液	凝胶终浓度				
	$T=3\%$	$T=5\%$	$T=10\%$	$T=15\%$	$T=20\%$
单体贮液（ml）	3.4	5	10	15	20
浓缩胶缓冲液贮液（ml）	2.4	—	—	—	—
分离胶缓冲液贮液（ml）	—	7.5	7.5	7.5	7.5
10% SDS（ml）	0.2	0.3	0.3	0.3	0.3
双蒸水（ml）	14	17.2	12.2	7.2	2.2
10%过硫酸铵（μl）	10	10	10	10	10
10%TEMED（μl）	10	10	10	10	10

注：①过硫酸铵应在即将灌胶前加。

②过硫酸铵和 TEMED 的量应根据室温或聚合情况而定。

③欲配制不同终浓度，不同厚度或不同大小的凝胶，可根据表中的体积按比例变化。

灌注水平电泳用的凝胶可以先灌注浓缩胶，接着灌注分离胶，所以在浓缩胶中应加适量的 87% 甘油，见表 5.6。灌注方法请参阅 4.2.1.2 节。

表 5.6　SDS 不连续电泳用的凝胶配方（水平电泳用）[38]

贮 液	凝胶终浓度				
	$T=3\%$	$T=5\%$	$T=10\%$	$T=15\%$	$T=20\%$
单体贮液（ml）	3.4	5	10	15	20
浓缩胶缓冲液贮液（ml）	2.4	—	—	—	—
分离胶缓冲液贮液（ml）	—	7.5	7.5	7.5	7.5
87% 甘油（ml）	1.0	0.3	0.3	0.3	0.3
10% SDS（ml）	0.2	0.3	0.3	0.3	0.3
双蒸水（ml）	13	16.9	11.9	6.9	1.9
10%过硫酸铵（μl）	10	10	10	10	10
10% TEMED（μl）	10	10	10	10	10

注：同表 5.5。

1980 年 Görg 等[17~19]介绍薄层聚丙烯酰胺小孔梯度凝胶 SDS 电泳。由于小孔梯度凝胶的分子筛效应以及甘油黏度减小了电泳中的扩散，即使对宽范围分子质量的复杂样品也能很好地分离并精确地计算其亚基分子质量。

小孔梯度凝胶的灌注方法参见 4.2.1.2 节。凝胶配方见表5.7[38]，贮液配置如下：

（1）丙烯酰胺单体贮液

14.55g 丙烯酰胺 + 0.45g N，N'-甲叉双丙烯酰胺，先用 35ml 双蒸水溶解，搅拌，直到溶液变成透明，再用双蒸水稀释至 50ml，过滤。用棕色瓶可在 4℃ 保

存一个月。两种单体和溶液都是中枢神经毒物，要小心操作。

(2) 浓缩胶缓冲液贮液（0.5mol/L Tris-HCl，0.4% SDS，pH 6.8）

3.03g Tris+0.2g SDS+5 mg 叠代钠溶解在 40ml 双蒸水中，用 4 mol/L 盐酸调至 pH6.8，再用双蒸水加至 50ml。4℃保存。

(3) 分离胶缓冲液贮液（1.5mol/L Tris-HCl，0.4% SDS，pH8.8）

9.08g Tris+0.2g SDS+5mg 叠代钠溶解在 40ml 双蒸水中，用 4mol/L 盐酸调至 pH8.8，再用双蒸水加至 50ml。4℃保存。

(4) 40%过硫酸铵

400 mg 过硫酸铵溶在 1 ml 双蒸水中，使用前新鲜配置。

表 5.7　小孔梯度 SDS 凝胶配方[38]

贮　液	浓缩胶 T=4% C=3%	梯度胶终浓度 T（C=3%） 4%～22.5% D	4%～22.5% L	8%～18% D	8%～18% L	10%～22.5% D	10%～22.5% L
单体贮液（ml）	0.65	1.3	7.5	2.7	6	3.3	7.5
浓缩胶缓冲液贮液（ml）	1.25	—	—	—	—	—	—
分离胶缓冲液贮液（ml）	—	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
87%甘油（ml）	1.4	2.8	—	2.8	—	2.8	—
双蒸水（ml）	1.7	3.4	—	2.0	1.5	1.4	—
40%过硫酸铵（μl）	4	9	9	9	9	9	9
TEMED（μl）	3	5	5	5	5	5	5

注：①D 代表重液，加在混合腔中，L 代表轻液，加在贮液腔中。
②过硫酸铵应在即将灌胶前加。过硫酸铵和 TEMED 的量应根据室温和聚合情况而定。
③欲配制不同终浓度，不同厚度和不同大小的凝胶，可根据表中的体积按比例变化，等体积混合重液和轻液。

5.2.2　样品的准备

5.2.2.1　样品缓冲液的配制

根据 SDS 电泳的原理，样品缓冲液中必须含有 3～4 倍于蛋白的 SDS 和足以断裂二硫键的还原试剂（2%～3%二硫苏糖醇或 4%～5% β-巯基乙醇）。由于巯基乙醇具有强挥发性，最好在配制样品前再将其加到样品缓冲液中。配制好的样品还必须在 100℃水浴中保温 3～5 分钟（对一些样品可在 37℃保温 6 小时）。在每克蛋白质断裂二硫键并结合 1.4g 单体 SDS 后，SDS-多肽胶束带负电，具有恒定的荷/质比。胶束的斯托克斯（Stokes）直径和分子质量成正比，通常在样品溶液中加 1%到 2%（*W*/*V*）SDS，在凝胶中加 0.1% SDS。

连续电泳的样品缓冲液可根据缓冲系统选择如下[38]：

1）磷酸缓冲系统的样品缓冲液（0.01 mol/L，pH7.1）：0.2g SDS + 1 ml 磷酸缓冲液贮液（0.2 mol/L，pH7.1）+ 0.2 ml β-巯基乙醇 + 0.1 mg 溴酚蓝，用双蒸水稀释到 20 ml。4℃保存。

2）咪唑缓冲系统的样品缓冲液（0.01 mol/L，pH7.0）：0.2g SDS + 2 ml 咪唑缓冲液贮液（0.1 mol/L，pH7.0）+ 0.2 ml β-巯基乙醇，+ 0.1 mg 溴酚蓝，用双蒸水稀释到 20 ml。4℃保存。

不连续电泳的样品缓冲液（0.08 mol/L Tris-HCl，pH6.8）[38]通常用 1.6ml 浓缩胶缓冲贮液（1mol/L Tris-HCl，pH6.8）+ 4 ml 10% SDS + 0.3g 二硫苏糖醇（或 1ml β-巯基乙醇）+ 2.5ml 87% 甘油 + 0.1 mg 溴酚蓝，用双蒸水稀释到 20ml。4℃保存。如采用 pH8.8 Tris-HCl 缓冲液或其他缓冲液会得到不同的分离结果[39]。

小孔梯度 SDS 电泳样品缓冲液（0.15 mol/L Tris-HCl，1% SDS）的配制[38]：0.2g SDS + 2 ml 凝胶缓冲贮液（1.5 mol/L Tris-HCl，0.4% SDS，pH8.8）+ 0.1mg 溴酚蓝，用双蒸水稀释到 20 ml，4℃保存。

5.2.2.2 蛋白标准的准备

选择合适分子质量范围的市售蛋白标准或自己配置一套蛋白标准（5～7 种蛋白）溶解在样品缓冲液中，与样品一样在 100℃煮3～5分钟，分装，在 -20℃可保存 6 个月。但使用前还需再煮和加适量 β-巯基乙醇（如果样品缓冲液中是用 β-巯基乙醇作还原剂）。

5.2.2.3 样品浓度和加样要求

样品溶解后应分装。如短期保存，可放在 4℃，如长期保存应放在 -20℃。使用前还需再次在 100℃煮 3～5 分钟，并加β-巯基乙醇（如样品缓冲液中原来用 β-巯基乙醇作还原剂）。

样品浓度和加样要求同常规聚丙烯酰胺凝胶阳极电泳，请参阅 4.2.2.3 和 4.2.2.4 节。

5.2.3 电　泳

5.2.3.1 垂直电泳

SDS 和常规聚丙烯酰胺凝胶垂直电泳的方法基本相同。请参见 4.2.3.1 节。将缓冲液贮液稀释一倍便为连续电泳的电极缓冲液。不连续 SDS 电泳的电极缓冲液常用 Tris-甘氨酸系统（0.025 mol/L Tris，0.192 mol/L 甘氨酸，0.1% SDS，pH8.3）。

5.2.3.2 水平电泳

和常规聚丙烯酰胺凝胶电泳一样，SDS水平电泳目前也有三种方式，即经典的搭接滤纸桥的方式和二种半干方式。前者操作麻烦，电泳时间长。半干技术在保证分辨率的前提下，电泳时间只需1小时（分离距离8cm），且节省材料，操作简便。请参阅4.3.6节和5.3.6节"实验考虑"。

搭滤纸桥的SDS水平电泳方法与常规聚丙烯酰胺凝胶电泳的方法相同，参见4.2.3.2节。连续和不连续电泳的电极缓冲液和上述的SDS垂直电泳相同。电泳可采用恒电流方式，加样时用低电流，以使样品分子可顺利地进入凝胶[38]，见表5.8。

表5.8 SDS连续和不连续电泳的参数[38]

缓冲液系统		磷酸		咪唑		Tris-甘氨酸	
凝胶浓度		5%	10%	5%	10%	3.5%	7.5%
预电泳	恒电流(mA)	150	150	80	80	50	30
	时间（min）	20	20	20	20	20	20
加样	恒电流（mA）	20	20	20	20	20	20
	时间（min）	10	10	10	10	10	10
电泳	恒电流（mA）	200	190	100	100	50	40
	场强（V/cm）	5	6	12	15	15	15
溴酚蓝前沿的迁移速度（cm/h）		1.5	1.2	4.0	3.2	4.5	1.8
总电泳时间（h）		4	5	1.5	2.5	1.5	3

小孔梯度聚丙烯酰胺凝胶SDS电泳的电极缓冲液也为0.025mol/L Tris，0.192mol/L甘氨酸，0.1% SDS，pH8.3。电泳条件则常采用恒功率方式，见表5.9。

表5.9 小孔梯度聚丙烯酰胺凝胶SDS电泳的条件（分离距离8cm）[38]

	电压（V）	电流（mA）	功率（W）	时间（min）	温度（℃）
预电泳	600	50	30	15	15
加样	200	20	20	5	15
电泳	600	60	30	80	15

5.2.4 检　　测

在 SDS 电泳中，由于 SDS 和还原试剂使蛋白质变性而失去生物活性，所以电泳后的检测方法不如常规聚丙烯酰胺凝胶电泳和等电聚焦电泳多，一般为考马斯亮蓝染色和银染色，其次为荧光方法和转移后检测。

5.2.4.1 考马斯亮蓝染色

考马斯亮蓝染色的原理和方法请参见 4.2.4.2 节，由于 SDS 和蛋白质分子竞争染料而干扰考马斯亮蓝染色，所以 SDS 电泳后凝胶的固定和染色时间应比常规聚丙烯酰胺凝胶的长 1 倍左右[38]或用多倍体积的染色液染色，以排除 SDS 的影响。

除了在 4.3.4.2 节中所述的一些常规考马斯亮蓝染色方法以外，近年还有一些新的方法可供选用。作者[16]使用的方法操作快而简便，并且可以得到非常清晰的背景。

Neuhoff 等[40]介绍了一种高灵敏度的染色方法（30ng/带），无背景色，但需要过夜。

染色液：在 980ml 2%磷酸中加 100 g 过硫酸铵，直到完全溶解。再加 1g 考马斯亮蓝 G-250（溶在 20ml 水中），不需过滤，使用前振摇。

固定：将凝胶放在 12%三氯醋酸中固定 1 小时。

染色：取 160ml 上述染色液，在染色时加 40ml 甲醇。凝胶染色放置过夜。

染色后用 0.1 mol/L Tris-磷酸缓冲液（pH6.5）漂洗 1 至 3 分钟。再用 25%（V/V）乙醇淋洗不超过 1min。然后在 20%硫酸铵中稳定蛋白-染料复合物。

Barnes 等的快速染色方法[41]是将凝胶放在 0.02%考马斯亮蓝R-350（溶于 10%醋酸）中，在 50℃加热 15 分钟。然后用 10%醋酸在室温脱色 2 小时便可。

另一种快速的染色方法[42]是将凝胶固定 10～15 分钟（固定液：25%异丙醇，10%醋酸），染色 2 小时（0.06%考马斯亮蓝 G-250，10%醋酸）。如果加热染色，便可缩短时间。

Lundy 等[43]介绍一种新的染色方法用来观察一些细胞培养液的上清液中的蛋白水解活性。将 SDS 电泳后的凝胶用含有甲醇的缓冲液漂洗，以除去 SDS。在 0.5%酪蛋白溶液中保温，再用考马斯亮蓝 R-250 染色。具有蛋白水解活性的带非常清晰，背景为蓝色。在同一块凝胶中的分子质量蛋白标准的染色带更深。用此方法可以测定蛋白水解物的亚基分子质量。这种方法只要作稍微的修改也可以用于检测常规聚丙烯酰胺凝胶和等电聚焦电泳后的蛋白水解活性。

Sreeramulu 和 Singh 报道[44]在考马斯亮蓝 R-250 染色后可用 0.5 mol/L NaCl 水溶液在 25℃脱色只需 2～3 小时（NaCl 的浓度应在 0.1～2 mol/L 范围内）。这

种方法的优点是不需要有机溶剂，而且用 NaCl 脱色的结果可得到深紫蓝色蛋白带，可提高定量测定的灵敏度，而用甲醇-醋酸脱色只能得到灰蓝色的蛋白带。

5.2.4.2 银染色

银染色的机制、种类和方法请参见 4.2.4.3 节，作者[16]根据 Heukeshoven 等[45,46]的方法改进的染色程序在国内很多实验室都得到了满意的结果，见表 5.10。关键是必须使用去离子双蒸水，甲醛和戊二醛必须是新鲜试剂，无聚合，其余试剂也应该用分析纯。染色在日光下进行，并不断振摇。

表 5.10　SDS 电泳后凝胶的银染色[16]

步骤	试剂	时间
固定	500ml 乙醇 100ml 冰醋酸 400ml 蒸馏水	至少 30 分钟
浸泡	75ml 乙醇 17g 醋酸钠 1.25ml 25%戊二醛 0.5g 硫代硫酸钠·$5H_2O$ 用蒸馏水溶解后加至 250ml	30 分钟
漂洗	用蒸馏水漂洗三次	5 分钟/次
银染	0.25g 硝酸银 50μl 甲醛 用蒸馏水加至 250ml	20 分钟
显色	6.25g 碳酸钠 25μl 甲醛 用蒸馏水加至 250ml	2～10 分钟视蛋白带显示深棕色
终止	3.65g EDTA-Na_2·$2H_2O$ 用蒸馏水加至 250ml	10 分钟
漂洗	用蒸馏水漂洗三次	5 分钟/次
保存	25ml 甘油 用蒸馏水加至 250ml	30 分钟取出晾干

银染色的第一步是固定。固定有两个目的：一是将蛋白固定在凝胶中或至少是防止蛋白在凝胶中扩散。第二个目的是去除干扰染色的物质，如去污剂，还原试剂和缓冲液的一些组分，如甘氨酸。固定液可以是甲醛[47]、乙醇（甲醇）和醋酸[48,49]或三氯醋酸[50]。固定后的凝胶才能由银颗粒显色。对 SDS 电泳的凝胶进行银染色，一定要在染色前除去 SDS，所以常经几次漂洗的程序。Kirkeby

等[51]提出应该用缩短固定时间来加速银染色的程序。最佳的固定应该是时间短，不会在染色时产生背景，能有效地固定蛋白，不影响蛋白与染色剂的反应，并且固定液的浓度应尽可能的低。他们用乙醇、醛和酸溶液预固定 10 分钟，然后用极低浓度的甲醛和戊二醛的乙醇溶液或甲醛（或戊二醛）的苦味酸和乙醇溶液仅仅固定 5 分钟，便可加速灵敏的银染程序。

多肽的银染由于分子小很难被固定，文献报道认为较好的固定剂是 12.5% 戊二醛[52]。

Swain 和 Ross[53]介绍了一种简单、灵敏、高分辨、低背景的银染方法见表 5.11。

表 5.11　蛋白质 SDS 电泳后的银染色[53]

程序	试剂	时间（min）
1. 固定	40%乙醇，10%醋酸	10
2. 漂洗	双蒸水	10
3. 固定/敏化	0.05%戊二醛，0.0037%甲醛，40%乙醇	5
4. 漂洗	40%乙醇	20
5. 漂洗	双蒸水	20
6. 敏化	硫代硫酸钠（0.2g/L）	1
7. 漂洗	双蒸水	1
8. 漂洗	双蒸水	1
9. 银染	0.1%硝酸银	20
10. 漂洗	双蒸水	1
11. 显色	2.5%碳酸钠，0.0148%甲醛	1①
12. 显色	2.5%碳酸钠，0.0148%甲醛	1②
13. 终止	5%醋酸	1③

注：① 当溶液转为黄色时，立即倒去溶液。
② 显色至蛋白带清晰可见。
③ 如必要，可将凝胶保存在 Na_2CO_3 溶液中。

组蛋白在 SDS 电泳后的银染色可采用甲醛和乙醇固定，但需要用 2,7-萘二硫酸钠（2,7-naphthalenedi sulfonic acid-Na_2）敏化和铵银染色[54]。组蛋白的银染色是比较困难的，酸性蛋白的银染也同样困难[55]。

Granzier 等[56]对分子质量在 0.7～3MDa 之间的巨型蛋白分子的可溶性和 SDS 电泳后的银染色进行了研究。Blum 等[57]对植物叶蛋白和病毒蛋白的银染色方法进行了改进。

5.2.4.3　其他染色方法

在用 Stains all 染色时[58]（参见 4.2.4.4 节），为了克服 SDS 的干扰，可以将凝胶放在 25%异丙醇中，在 50℃加热 15min。

Remazol Brilliant Blue R 可用于电泳前的蛋白染色。这种预染色方法在没有 SDS 时会降低蛋白质的溶解性[59]，所以适合于 SDS 电泳[60]。用这种染料预染血清，蛋白不会产生沉淀，且方法灵敏，可对蛋白进行半定量测定，但蛋白谱带会有变化[61,62]。

在酸性条件下，在有钼酸盐时，苯三酚红蛋白（pyrogallol red protein）检测是基于形成一个蓝色蛋白染料复合物（pyrogallol red - molybdate，PRM）。将 PRM 复合物离心，在 SDS 电泳前重新溶解。与三氯醋酸沉淀方法相比，此方法给出较均一和较好的回收率。可用于测定蛋白质和多肽的分子质量和痕量成分的检测，Marshall 介绍的此方法比较简单而经济[63]。

Vargic 等[64]用 α-萘吡喃葡萄糖苷（α-naphthyl glucopyranoside）作底物，酶反应得到的 α-萘酚用快红 B（fast red B）或快蓝 BB（fast blue BB）染色，快速而简单地检测了电泳后的外-β-1,3-葡聚糖酶。

Bath[65]在 SDS 电泳后将蛋白转移到硝酸纤维素膜上，并用亚金染料（Auro Dye）进行金染色，可以除去常见的纹理现象。

5.2.4.4 荧光探针法

荧光标记法请参阅 4.2.4.7。

糖蛋白在 SDS 电泳后也可用 PAS 试剂（periodic acid schiff）检测[66,67]。但 Carpenter 等[68]对 SDS 电泳分离后，用 PAS 反应不能检测的人唾液中的糖蛋白，将其转移到硝酸纤维素膜上，用外源凝集素探针（lectin probes），再用异硫氰酸盐（isothiocyanate）的荧光检测。Beeley 等[69]比较了三种方法：考马斯亮蓝 R-250，银染和荧光方法对人唾液中蛋白的检测。结果表示不论在分辨率和灵敏度方面，丹磺酰化——转移荧光的方法都给出最好的结果，特别是当蛋白中含有较多富碱性脯氨酸时。

Vesterberg[70]报道了用化学发光的方法检测非还原 SDS 琼脂糖电泳后的蛋白可以大大简化操作和提高灵敏度。

5.2.4.5 电泳转移

电泳转移请参阅第 11 章。

5.2.4.6 电泳后蛋白带的氨基酸组成和序列分析

电泳后蛋白带的氨基酸组成的分析方法请参阅 4.2.4.10。

电泳分离后蛋白质的 N 端氨基酸序列分析能通过与异硫氰酸苯酯（phenylisothiocyanate，PITC）反应，顺序地除去 N 端氨基酸来测定，即 Edman 降解法[71]。以后比较重要的改进是采用自动固相测序。蛋白质从凝胶中电洗脱后，共价结合到活化的玻璃支持物中或吸附在合成膜上[72]，然后用 HPLC 来鉴

别氨基酸衍生物，检测灵敏度可低至 1 pmol 以下。从电泳中分离微克量的蛋白便可用于序列分析[73, 74]。

5.2.4.7 电泳后的肽图分析

SDS 电泳后的多肽能用肽图来定性。在用胰蛋白酶消化以前先用放射性标记从凝胶中洗脱的蛋白可以提高灵敏度[75, 76]。Elder 等[77]介绍一种比较简单的方法，即用 SDS 电泳分离的多肽在凝胶上用放射性碘标记和用胰蛋白酶水解，肽片从凝胶上洗脱，再用双向层析和放射自显影分析。用这种方法分析的限制是蛋白质中必须含有对放射性碘化作用敏感的氨基酸残基。Cleveland 等[78]的快速方法是不进行洗脱，而在电泳后的凝胶上进行部分蛋白水解裂解，然后再进行第二向的，只根据分子大小分离的 SDS 电泳。原则上，在专一位置用裂解产生多肽的方法，例如用酸水解 Asp—Pro 键，用羟胺裂解 Asn—Gly 键，用 *N*-氯琥珀酰胺（*N*-chlorosuccinamide）裂解色氨酸残基，用溴化氰裂解甲硫氨酸残基等都能用于肽图分析。很重要的一点是要避免产生大量非常小的多肽，因为它们难以分析，而且很可能从凝胶中丢失。肽图分析的双向电泳方法请参见第 8 章。

5.2.5 照相、凝胶干燥

请参见 4.2.5 节。

5.2.6 定 量 测 定

请参见 4.2.6 节和 8.2.2.8 节。

5.3 实 验 考 虑

5.3.1 SDS 电泳是测定蛋白质亚基分子质量的最佳选择

与其他技术（光散射、渗透压、超速离心、层析法）相比，用 SDS 电泳测定亚基分子质量是一种简单、经济、快速、高分辨的好方法。因为 SDS-蛋白胶束都是均一的带负电，所以都向同一方向（阳极）迁移。而且胶束通常带有较多的负电荷，故有较高的迁移速度。用 SDS 处理后的多肽去折叠，呈伸展状态，分离可以在排阻性凝胶中完成，这样便可限制扩散，由此可得到高分辨率的窄带。

根据 SDS 电泳的原理，它主要用于蛋白质的分离、亚基组成的研究，得到的是亚基的分子质量，而不是完整蛋白的分子质量。虽然绝大部分蛋白质的亚基

分子质量的对数对 SDS 电泳的迁移率存在着线性关系，但是也有一部分蛋白质除外，如电荷异常或构象异常的蛋白质（组蛋白 F_1 本身带有大量的正电荷，结合的 SDS 不足以消除原来正电荷的影响）。带有较大辅基的蛋白质（如某些糖蛋白）以及一些结构蛋白（例如胶原蛋白）和一些含二硫键较多的蛋白质（有些受体）等，如使用常规的 SDS 电泳方法，它们的相对迁移率与分子质量的对数不呈线性关系。

SDS 电泳的方式与常规电泳一样，如果条件许可，水平电泳，特别是半干电泳是可取的方式，因为它同样具有操作方便，节省材料，电泳速度快等优点。

5.3.2 凝胶浓度和缓冲系统的选择

由于 SDS 电泳分离并不取决于蛋白质的电荷密度，只取决于分子解聚后 SDS-蛋白质胶束的大小，因此凝胶浓度的选择会直接影响分辨率，如图5.5。

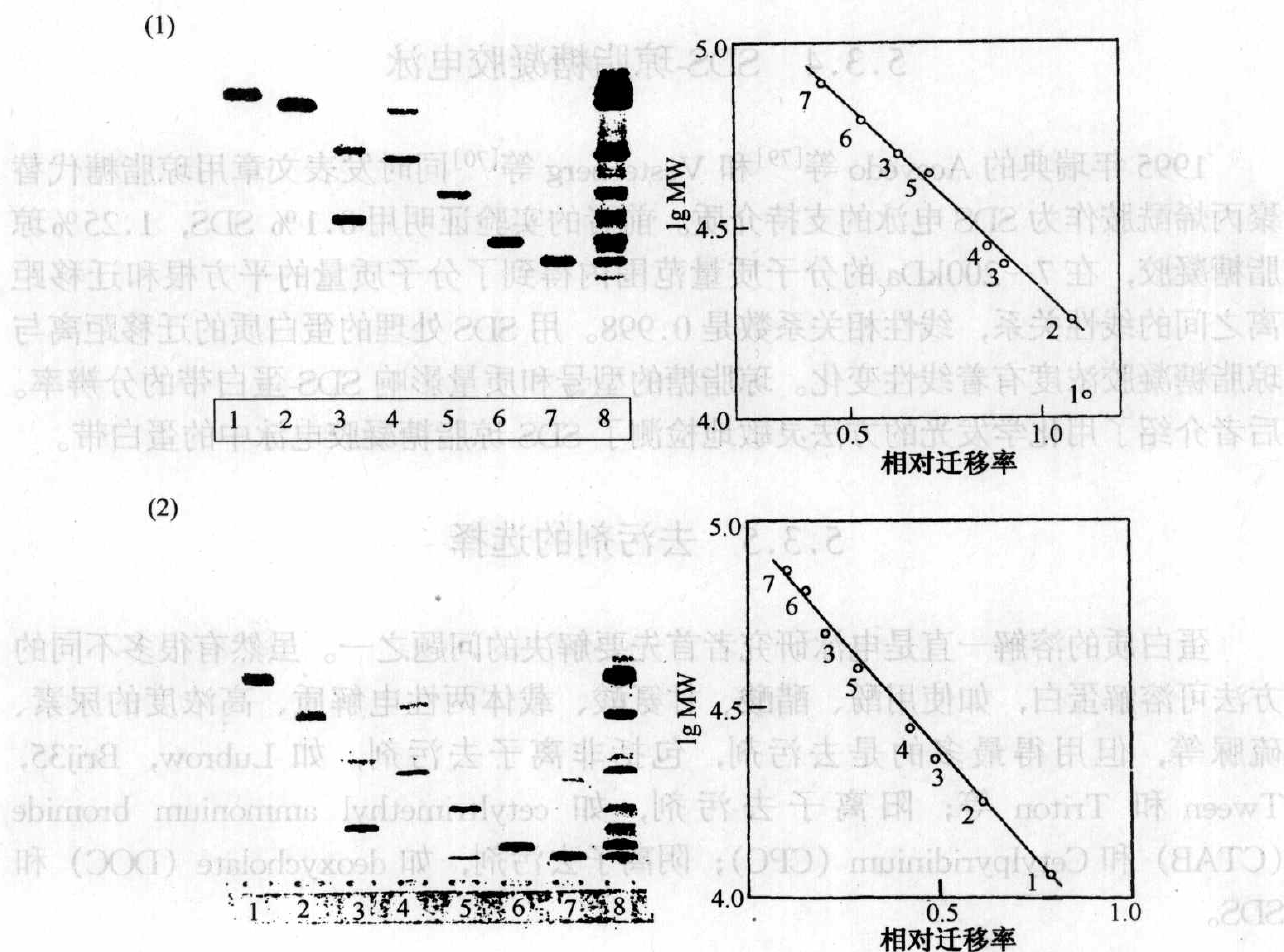


图 5.5 7 种蛋白质在不同凝胶浓度

(1) $T=5\%$；(2) $T=10\%$中的 SDS 电泳

1. 细胞色素 c，2. 肌球蛋白，3. γ-球蛋白，4. 碳酸酐酶，5. 卵白蛋白，6. 人白蛋白，7. 人转铁蛋白，8. 混合样品

在其他条件都相同的情况下，7种蛋白质在10%凝胶中分离后均不偏离直线，但在5%凝胶中分离后，细胞色素c的分子质量较小，偏离了直线。γ-球蛋白的轻链和碳酸酐酶的分离太小，使迁移距离难以测量。有关凝胶浓度的选择请参阅5.1.3。

虽然SDS电泳缓冲系统的选择比常规聚丙烯酰胺电泳要简单得多，但它直接影响蛋白带的分辨率和电泳的速度，请参阅5.1.2节。

5.3.3 SDS聚丙烯酰胺凝胶聚合不佳的原因对策

SDS聚丙烯酰胺凝胶聚合不佳的原因及对策，请参阅2.3，4.2.1，4.3.3和5.2.1节。

由于SDS和碱性缓冲液满足了过硫酸铵催化聚合所需要的碱性条件，所以通常比较容易聚合。

5.3.4 SDS-琼脂糖凝胶电泳

1995年瑞典的Acevedo等[79]和Vesterberg等[70]同时发表文章用琼脂糖代替聚丙烯酰胺作为SDS电泳的支持介质。前者的实验证明用0.1% SDS，1.25%琼脂糖凝胶，在7～200kDa的分子质量范围内得到了分子质量的平方根和迁移距离之间的线性关系，线性相关系数是0.998。用SDS处理的蛋白质的迁移距离与琼脂糖凝胶浓度有着线性变化。琼脂糖的型号和质量影响SDS-蛋白带的分辨率。后者介绍了用化学发光的方法灵敏地检测了SDS-琼脂糖凝胶电泳中的蛋白带。

5.3.5 去污剂的选择

蛋白质的溶解一直是电泳研究者首先要解决的问题之一。虽然有很多不同的方法可溶解蛋白，如使用酚、醋酸、甘氨酸、载体两性电解质、高浓度的尿素、硫脲等，但用得最多的是去污剂，包括非离子去污剂，如Lubrow，Brij35，Tween和Triton等；阳离子去污剂，如cetyltrimethyl ammonium bromide（CTAB）和Cetylpyridinium（CPC）；阴离子去污剂，如deoxycholate（DOC）和SDS。

5.3.5.1 阳离子和阴离子去污剂

阴离子去污剂SDS，作为变性剂和助溶剂虽然几乎可以溶解所有的蛋白，甚至包括疏水和变性的蛋白，所以SDS电泳通常是阳极电泳。高碱性蛋白（如精蛋白）和高酸性蛋白（如铁氧化还原蛋白）由于不能很好地结合SDS，在电泳

时，前者产生沉淀，后者会出现异常行为，所以应该用 CTAB 来代替 SDS[80]，方法与 SDS 电泳基本相同，只是电泳方向是向阴极迁移（阴极电泳）。在 $T=10\%$，$C=5\%$时，在 10～40kDa 之间能得到分子质量对数和迁移率之间的线性关系。但是 CTAB 会在凝胶中产生沉淀物，这种去污剂的过硫酸盐沉淀物使凝胶呈乳白色，所以不能用染色方法，而只能用丹磺酰化合物标记作荧光检测。但这仍然不能克服由于沉淀物引起的过硫酸盐的不均匀分布导致的 CTAB 的不均匀分布和凝胶的不均匀聚合。这两者都将影响蛋白和去污剂的结合平衡，而且沉淀颗粒的本身也影响蛋白迁移。在染色、脱色过程中，去污剂和染料结合也会产生沉淀物，所以染色最好在 80～100℃ 进行[81]。为避免作为催化剂的过硫酸铵导致沉淀物的产生，可采用光聚合的方法。

CPC 是另一种可用于代替 SDS 的阳离子去污剂[82]。凝胶聚合用硫酸铁-抗坏血酸作为催化系统。据报道在 17～160kDa 之间，分子质量对数和迁移率之间存在着线性关系。

5.3.5.2 非离子去污剂

由于阳离子和阴离子去污剂都能引起天然分子结构的变化，并使蛋白变性，大部分酶失去活性，抗原抗体失去免疫特性。虽然可以设法去除去污剂而恢复活性，但并不是所有蛋白都可以做到。所以许多膜蛋白和酶可以用非离子去污剂溶解，如 Tween 80、Triton 100 等，它们可以温和地使蛋白解聚，但保留活性。

由于去污剂的无离子特性，蛋白质的内部电荷在电泳分离中起着重要的作用，因此便于对分子质量小但带有不同电荷的蛋白进行分离。它的缺点是不同的蛋白并不具有恒定的荷-质比，所以不能用分子质量对数和迁移率的关系来测定分子质量，而必须用 Ferguson 作图法测得。Hearing 等[83]用 $T=4\%\sim15\%$，$C=3\%$的不连续凝胶（不去加污剂）研究了 33 种不同的纤维蛋白、球蛋白、糖蛋白和金属蛋白（样品中加 1% Triton 100），得到了很好的线性关系，平均误差 $\pm10\%$，略低于 SDS 电泳的结果（$\pm5\%$），这是因为 Triton 不影响水溶性蛋白的 K_R 和 Y_0 值，但影响结合大量去污剂的蛋白，如许多膜蛋白。它们的迁移率取决于蛋白—去污剂复合物的大小，而不只是蛋白质的大小。

5.3.5.3 酸-尿素去污剂

当蛋白质在低 pH，并有非离子去污剂时可进行阴离子电泳，蛋白质的迁移率取决于它们结合去污剂的能力以及去污剂和多肽链的疏水区之间的混合胶束的形成，也就是取决于蛋白质疏水区的特性，大小和净电荷。由于尿素的存在，去污剂的结合量被减少，电泳谱带随着尿素和去污剂的浓度的改变而改变。用很低交联度（$C=0.67\%$）的凝胶[84]和不连续电泳系统[85]对组蛋白的分离会有很好的结果，并且可以进而做双向电泳。

5.3.5.4 电荷位移电泳

Helenius 等[86]介绍了一种叫做电荷位移电泳（charge shift electrophoresis）的技术，它可用于鉴别从外面结合到膜上的疏水蛋白以及有很强疏水性的两性蛋白形成的一个完整的膜结构的差别。这种电泳用 pH9.0，含有 0.1mol/L NaCl，0.5% Triton 的 0.05 mol/L 甘氨酸-氢氧化钠缓冲液，1% 的琼脂糖凝胶进行。样品可用阳离子去污剂、阴离子去污剂或非离子去污剂处理。有阳离子和阴离子去污剂存在时，两性蛋白的迁移率与无离子去污剂存在时是不同的。因为亲水蛋白和外周的膜蛋白结合相对比较少的 Triton X-100，但两性蛋白在疏水区周围结合比较多的非离子去污剂[87]。

5.3.6 样品的处理

蛋白质是通过分子内和分子间的氢键，疏水相互作用以及半胱氨酸之间的二硫键来维系它们的天然结构的（三级和四级结构）。在蛋白溶液中加入过量的 SDS 后，可以引起以下的反应：蛋白质本身的电荷变化被屏蔽；氢键被断裂；疏水相互作用被取消；多肽被去折叠（二级结构破坏），并形成椭球形。

在每克蛋白质结合 1.4g SDS 单体后，所有的 SDS-多肽胶束都带负电，且有恒定的荷-质比。胶束的斯托克斯（Stokes）直径和分子质量成正比。通常在样品溶液中加 1% 到 2%（*W*/*V*）SDS。在凝胶中加 0.1% SDS。

样品处理的方法对分离的质量和它的重复性是很重要的。根据分离的目的可以分为三种处理的方法[39]。

5.3.6.1 还原 SDS 处理

当加入还原试剂二硫苏糖醇（DTT）或 β-巯基乙醇后，蛋白质被完全去折叠，只根据亚基分子质量分离，见图 5.6。为防止氧化，还原剂贮液应在使用前配制。DTT 终浓度通常为 2%～3%。β-巯基乙醇的终浓度通常为 4%～5%。后

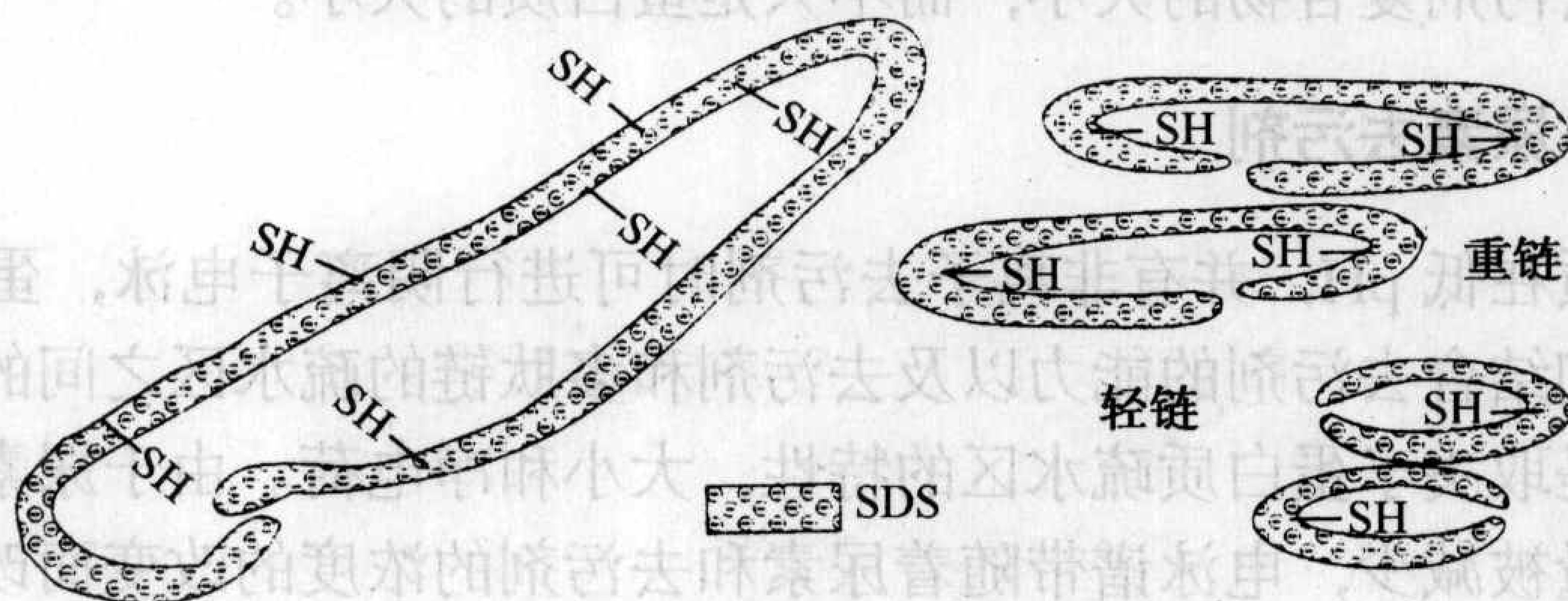


图 5.6　SDS 和还原处理的蛋白[39]

者由于具有极强的挥发性，每次使用应新鲜配制。使用 DTT 的优点一是没有臭味，二是当在同一块凝胶上需要同时分离还原和非还原样品时不会因扩散而影响非还原蛋白的分离。由于在加热时还原试剂可能被氧化，冷却后有时需要再加还原试剂以防止蛋白的重新折叠和亚基的缔合。忘记这一步可能在高分子质量范围产生“鬼带”（ghost band），在加样处产生沉淀。EDTA 可以阻止 DTT 的氧化，所以当系统中有 EDTA 时，可免去这一步。

5.3.6.2 带有烷基化作用（alkylation）的还原 SDS 处理

碘乙酰胺（iodoacetamide）的烷基化作用可以很好地并且经久牢固地保护 SH 基团，而得到窄的谱带（见图 5.7）。但对含有很多带 SH 基团的蛋白，被测得的分子质量会略有增加。另外，碘乙酰胺可以捕集过量的 DTT 而防止在银染时的纹理现象。碘乙酰胺的烷基化作用最佳条件是 pH8.8，离子强度较高，0.4mol/L。在样品加热并冷却后，在 100μl 样品缓冲液中加 10μl 20%（*W*/*V*）的碘乙酰胺，并在室温保温 30 分钟。

碘乙酸（iodoacetic）和乙酰吡啶（vinylpyridine）也可用作烷基化试剂[88]。

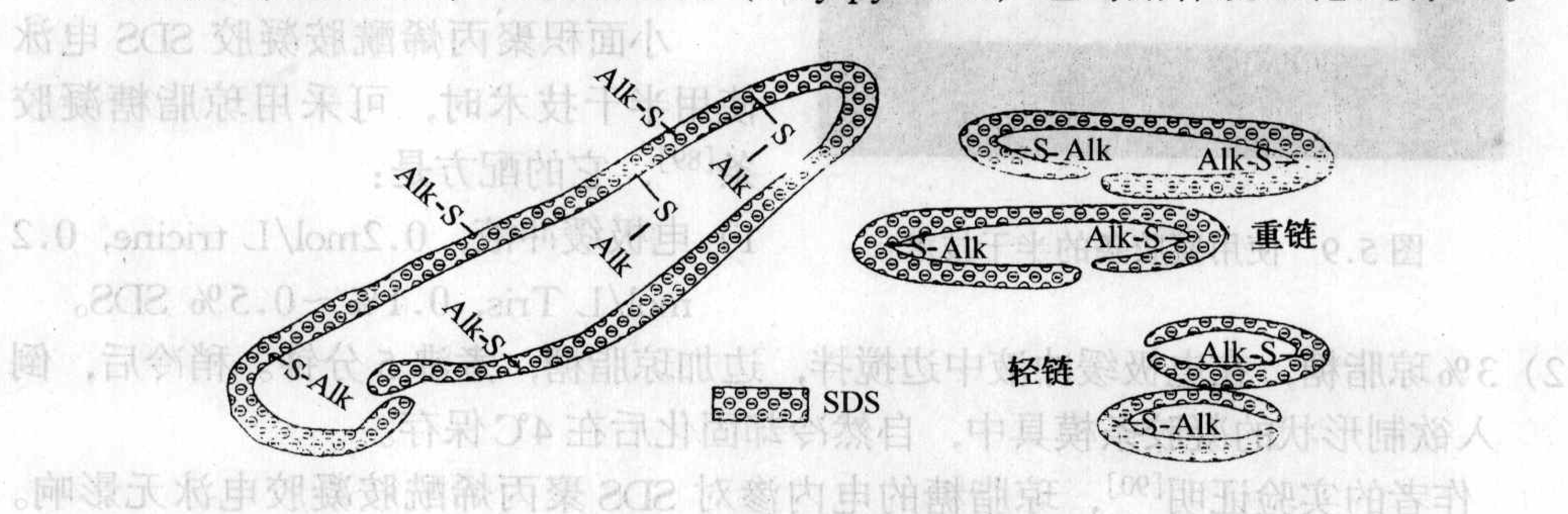


图 5.7 用 SDS 还原处理和烷基化的蛋白[39]

5.3.6.3 非还原的 SDS 处理

许多样品，如生理体液、血清或尿素，一般只需用 1% SDS 在 100℃煮 3 分钟，并不需要加还原试剂，此时二硫键不能被断裂，蛋白并没有完全被去折叠

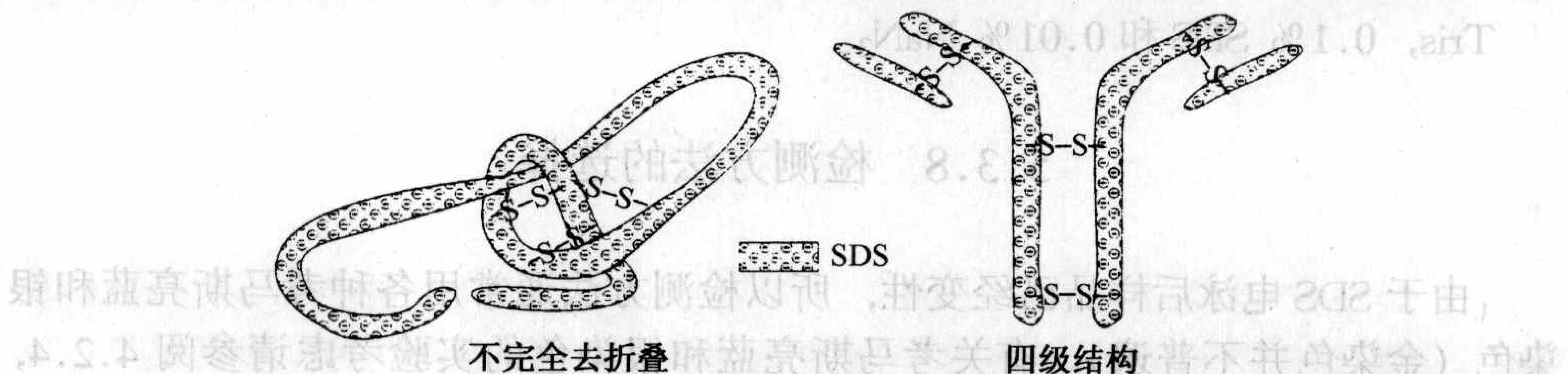


图 5.8 SDS 和非还原处理的蛋白[39]

(见图 5.8)。因为在这样的实验中并不希望破坏免疫球蛋白的四级结构而得到分离，所以不能用此方法来测定亚基分子质量。

5.3.7 半干技术

SDS 电泳半干技术的原理和方法基本上同常规聚丙烯酰胺凝胶电泳，请参阅 4.3.6 节。大面积聚丙烯酰胺凝胶 SDS 电泳使用半干技术时，应采用聚丙烯酰胺凝胶条[16]，见图 5.9。它的配方是：

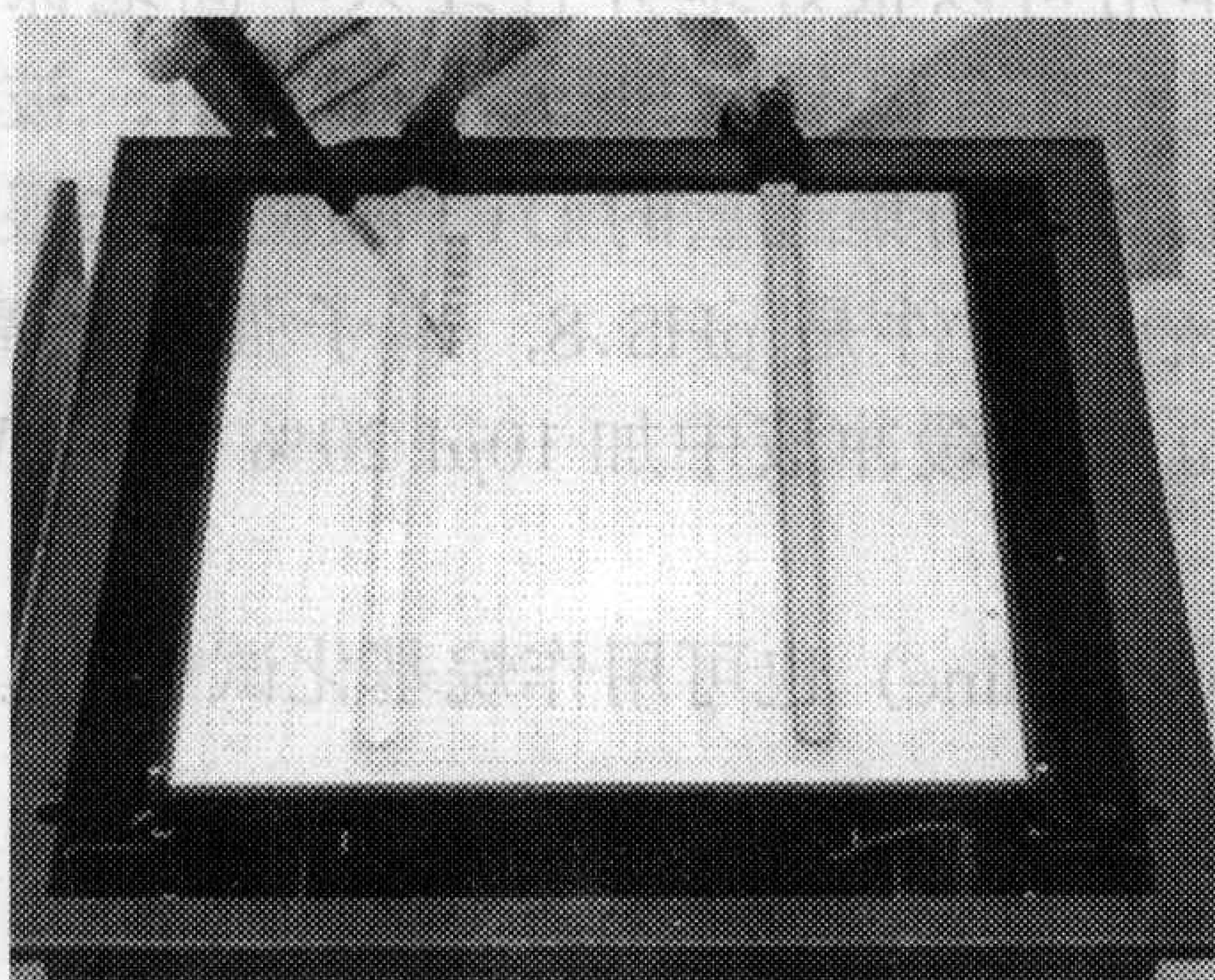


图 5.9 使用凝胶条的半干技术

1）阳极 SDS 缓冲液凝胶条，T = 12%，C = 3% 0.30mol/L Tris，0.30mol/L 醋酸，4g/L SDS，pH6.4。
2）阴极 SDS 缓冲液凝胶条，T = 12%，C = 3%，0.08 mol/L Tris，0.80 mol/L 三羟甲基氨基甘氨酸（tricine），4g/L SDS，pH7.1。

小面积聚丙烯酰胺凝胶 SDS 电泳使用半干技术时，可采用琼脂糖凝胶条[89]，它的配方是：

1）电极缓冲液，0.2mol/L tricine，0.2 mol/L Tris，0.1%～0.5% SDS。
2）3%琼脂糖，在电极缓冲液中边搅拌，边加琼脂糖，煮沸 5 分钟。稍冷后，倒入欲制形状的凝胶条模具中，自然冷却固化后在 4℃保存。

作者的实验证明[90]，琼脂糖的电内渗对 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳无影响。这对琼脂糖的选择提供了方便和经济的根据。

使用滤纸块进行半干电泳的方法比上述两种凝胶条的方法更简便。操作方法同 4.3.6 节。电极缓冲液的配方如下[91]：

1）阳极缓冲液（pH6.4），0.3mol/L Tris-乙酸，0.1% SDS，0.01% NaN_3 和少许溴酚蓝。
2）阴极缓冲液（pH7.1），0.8mol/L 三羟甲基氨基甘氨酸（tricine），0.08mol/L Tris，0.1% SDS 和 0.01% NaN_3。

5.3.8 检测方法的选择

由于 SDS 电泳后样品已经变性，所以检测方法通常用各种考马斯亮蓝和银染色（金染色并不普遍）。有关考马斯亮蓝和银染色的实验考虑请参阅 4.2.4，4.3.7 和 5.2.4 节。

通常 SDS 电泳凝胶染色后，更易脱色，并且得到更高的灵敏度，如同样的银染方法，在常规聚丙烯酰胺凝胶电泳和等电聚焦电泳中，灵敏度为 1～5ng，但 SDS 电泳可达 0.3ng[92]。

5.3.9 生物活性的恢复

如前所述，在常规聚丙烯酰胺凝胶电泳后，在凝胶中或洗脱后可以检测天然蛋白的生物活性。SDS 电泳后也有这种可能性。从蛋白中除去所有的 SDS，许多蛋白会恢复活性，或至少恢复部分活性。因为 SDS 不一定导致不可逆变性，但有许多因子影响活性的恢复。

1）SDS 的纯度：市售的 SDS 由于有长链烷基硫酸盐和少量亲脂化合物如十二烷基醇（dodecyl alcohol，DDA），1-十二碳酰（1-dodecene），双十二烷脂（di-dodecyl ether DDE）和双十二烷基硫酸盐（didodecyl sulfate，DDS）等的存在，它们与蛋白的结合比 SDS 紧，因而影响了蛋白活性的恢复。
2）蛋白酶的影响：在样品准备过程中，蛋白酶降解蛋白，因而影响了生物活性的恢复。
3）二硫键对活性没有贡献的蛋白和非均一亚基组成的蛋白，最容易被恢复活性。
4）尽可能慢地排除所有结合和非结合的 SDS，使变性蛋白有足够的时间去恢复天然的构象而复性，所需的时间取决于蛋白的结构[93]。
5）在恢复活性所用的缓冲液中应包括在电泳过程中被迁移出的辅助因子和辅酶。高浓度底物，氯化钠，甘油和硫赶还原试剂，如 DTT 的存在也将对酶的活性的恢复有利，但硫赶试剂的浓度必须保持低水平[94,95]。
6）疏水蛋白恢复活性时，必须用无离子去污剂或两性离子去污剂替代 SDS，以保持蛋白的可溶性。

SDS 电泳后，可在凝胶中、电洗脱后，在自由溶液中或固定在转移膜上恢复蛋白的生物活性。Hjerten[96]对可溶性膜蛋白的活性的恢复进行了详细的讨论。

5.3.9.1 在凝胶中恢复活性

只有单体蛋白和有相同亚基组成的蛋白才能使用这种形式恢复活性。因为对非均一蛋白来说，不同尺寸亚基多肽链将定位在凝胶的不同地方，用异丙醇、醋酸、水（5:2:13）能除去大部分 SDS，随后用缓冲液或用含 25% 异丙醇的缓冲液来洗。另一种方法是只用缓冲液洗或用甘油、底物、硫赶试剂、高盐或无离子去污剂洗。SDS 也可以在有尿素时再进行连续电泳，即双向电泳来除去[97]。第一向 SDS 电泳后分离蛋白，然后在有尿素和 NP-40 时进行第二向电泳，从多肽中去除 SDS。凝胶再被平衡以除去尿素，多肽便能恢复活性，并能借助于生物活性定位检测。

5.3.9.2 电泳转移后恢复生物活性

如果在电泳后需要保存原始结果时，这是一种可选的方法。用洗膜或再进行一次连续电泳的方法，便可从固定在膜上的蛋白中除去 SDS。蛋白仍然能被固定在膜上检测活性或洗脱后检测。

5.3.9.3 洗脱后在自由溶液中恢复生物活性

从 SDS 电泳后的凝胶中洗脱 SDS-多肽复合物的一个需要立即解决的问题是完全除去 SDS。只用透析方法通常不够有效。Weber 等[98]先用尿素，然后用 Dowex 树脂除去 SDS，再用透析除去尿素，蛋白便被慢慢恢复活性。对某些蛋白可在电泳后用氯化钾染色，切出可见蛋白带的凝胶，磨碎，在含有 0.1% SDS 的缓冲液中扩散洗脱，再用醋酸沉淀浓缩，沉淀溶解在盐酸胍中，再使多肽复性，活性恢复的百分比取决于使用的方法和蛋白的性质[93]。除去 SDS 的另一个方法是离子对萃取[99]和用离子-阻滞树脂（ion-retardation resins）[100]，使用这个方法时蛋白回收率通常高于 80%。

5.3.10 电泳过程中的不正常现象和对策

SDS 电泳过程中的不正常现象和对策与常规聚丙烯酰胺凝胶电泳基本相同，请参见 4.4.7 节。

5.3.11 电泳结果的分析

SDS 电泳的结果分析与常规聚丙烯酰胺凝胶电泳相同。请参阅 4.3.9 节。

参考文献

[1] Shapiro A L, Vinuela E, Maizel J V Jr. Biochem. Biophys. Res. Commun., 1967 (28): 815

[2] Weber K, Osborn M. J. Biol. Chem., 1969 (244): 4406

[3] "Acrylamide g casting handbook" pharmacia Biotech AB, Uppsala, Sweden, 1994. 21～28

[4] Ptt-Rivers R, Impiombato F S A. J. Biochem., 1968 (109): 825

[5] Finlayson G R Chrambach A. Anal. Biochem., 1971 (40): 292

[6] Reynolds J A. Tanford C. Proc. Natl Acad. Sci. U. S. A. 1970 (66): 1002

[7] Reynolds J. Biol. Chem., 1970 (245): 5161

[8] Lanzillo JJ, Stevens J, Fanburg B L. Electrophoresis, 1980 (1): 180～186

[9] Fairbanks G, Steck T L, Wallach D F H. Biochemistry, 1971 (10): 2606

[10] Swank R T, Munkres K D. Anal. Biochem., 1971 (39): 462

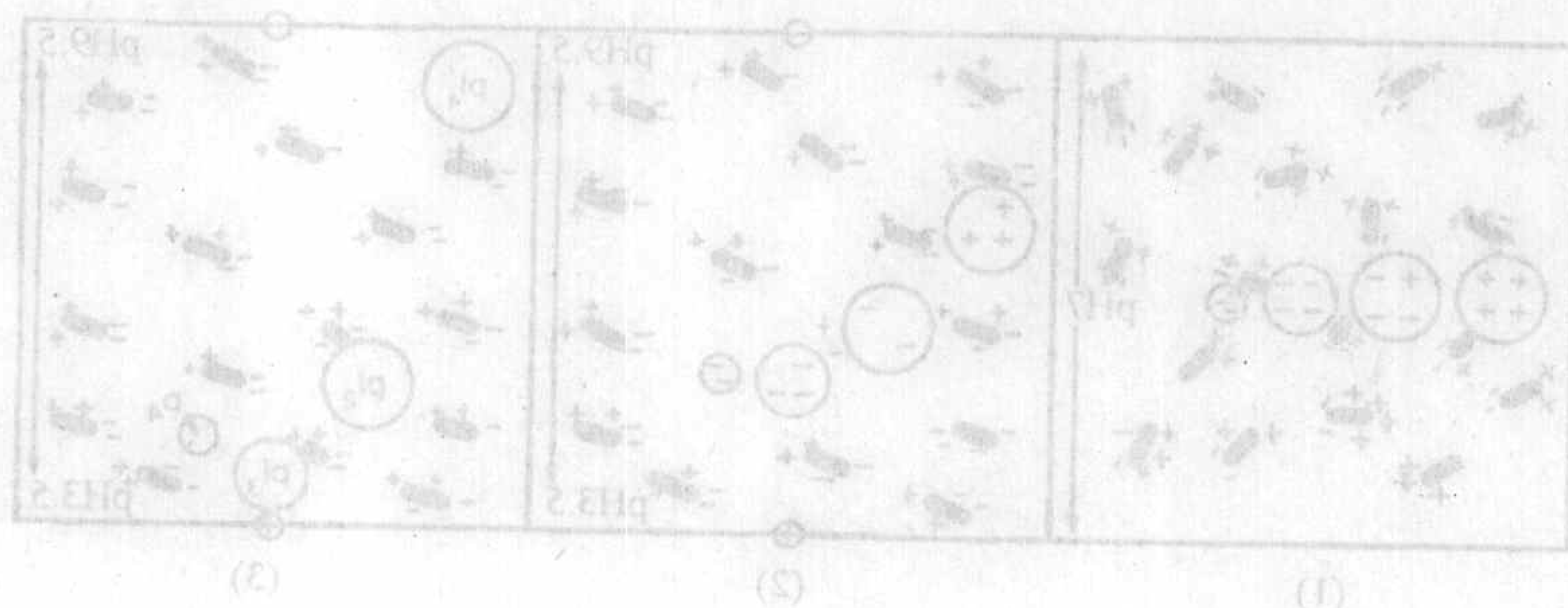
[11] Laemmli U K. Nature, 1970 (227): 680

[12] Ornstein L. Ann. NY Acad. Sci., 1964 (121): 321

[13] Davis B J. Ann. NY Acad. Sci., 1964 (121): 404
[14] Francis Jr R T, Davis J R, Sayre M, Rocha E. J. Chrom., 1984 (298): 115~121
[15] Poduslo J F, Anal. Biochem., 1981 (114): 131~139
[16] 郭尧君. 生物化学与生物物理进展, 1991 (18): 32~37
[17] Görg A, Postel W, Westermeier R, Gianazza E, Righetti P G. J. Biochem. Biophys. Methods, 1980 (3): 273~284
[18] Görg A, Postel W, Westermeier R, Gianazza E., Righetti P G. In Electrophoresis '81, Allen, R. C. and Arnaud, P. (eds), de Gruyter, Berlin, 1981. 257~270
[19] Görg A, Postel W, Westermeier R, Z. Lebensm. Unters. Forsch., 1982 (174): 282~285
[20] Westermeier R, Postel W, Görg A Telek L. J. Sci. Food Agric., 1985 (36): 135~141
[21] Schiwara H W, Weser J, Postel W, Görg A. In Electrophoresis '84, Neuhoff, V. (Ed.), VCH Publisher, Weinheim, F. R. G. 1984.429~432
[22] Görg A, Postel W, Weser J, Schiwara H W, Boesken W H. Science Tools, 1985 (32): 5~9
[23] Schiwara H W, Hebel T, Kirchherr H, Postel W, Weser J, Görg A. Electrophoresis, 1986 (7): 496~504
[24] Ferguson K. A. Metabolism, 1964 (13): 21
[25] Chrambach A, Rodbard D. Science, 1971 (172): 440
[26] Rodbard D, Chrambach A. Proc. Nat. Acad. Sci., USA. 1970 (65): 970
[27] Fish W W, Reynolds J A, Tanford C. J. Biol. Chem., 1970 (245): 5166
[28] Neville D M. J. Biol. Chem., 1971 (246): 6328
[29] Tracy R P, Chan S H P. Biochim. biophys. Acta., 1979 (576): 109
[30] Anderson M, Cawston T E, Cheeseman G C. Biochem., 1974 (139): 653
[31] Payne J W. J. Biochem., 1973 (135): 867
[32] Amersham Biosciences 公司 2004 年目录, 404
[33] Amersham Biosciences 公司 2004 年目录, 405
[34] Schägger H, Von Jagow G. Anal. Biochem., 1987 (166): 368~379
[35] Williams J G, Gratzer W B. J. Chromatogr, 1971 (57): 121
[36] Lanzillo J J, Stevens J, Fanburg B L. Electrophoresis, 1980 (1): 180
[37] Kyte J, Rodriguez H. Anal. Biochem., 1983 (133): 515~522
[38] Users Manual of Multiphor Ⅱ Electrophoresis System Pharmacia LKB Biotechnology AB uppsala. Sweden. 1992.162~187
[39] Westermeier R. Electrophoresis in Practice. VCH. press. Weinheim. 1993.167~171
[40] Neuhoff V, Stamm R, Eibl H. Electrophoresis, 1985 (6): 427~448
[41] Barnes N, Czybulka S G, Habeck C. "Electrophoresis in Practice" VCH press Weinheim. 1993.181
[42] "Protein electrophoresis application guide" Hoefer Scientific instruments. Califonia USA 1994. 40
[43] Lundy F T, Magee A C, Blair I S, Mc Dowell D A. Electrophoresis, 1995 (16): 43~45
[44] Sreeramulu G, Singh N K. Electrophoresis, 1995 (16): 362~365
[45] Heukeshoven J, Dernick R. Electrophoresis, 1985 (6): 103~112
[46] Heukeshoven J, Dernick R. Electrophoresis, 1986 (1): 22
[47] Oakley B R, Kirsch D R, Morris N R. Anal. Biochem., 1980 (105): 361
[48] Sammons D W, Adams L D, Nishizawa E E. Electrophoresis, 1981 (2): 135
[49] Morrissey J H. Anal. Biochem., 1981 (117): 307
[50] Confavreux C, Gianazza E, Chazot G, Lasne Y, Arnaud P. Electrophoresis, 1982 (3): 206

[51] Kirkeby S, Moe D, Bφg-Hansen T C. Electrophoresis, 1993 (14): 51~55
[52] Heukeshoven J, Dernick R. Electrophoresis, 1985 (6): 103
[53] Swain M, Ross N W. Electrophoresis, 1995 (16): 948~951
[54] Rabilloud T, Girardot V, Lawrence J J. Electrophoresis, 1996 (17): 67~73
[55] Merril C R. Goldmarn D, van Keuran M C. Electrophoresis, 1982 (3): 17
[56] Granzier H L M, Wang K. Electrophoresis, 1993 (14): 56~64
[57] Blum H, Beier H, Gross, H J. Electrophoresis, 1987 (8): 93~99
[58] Dahlberg A E, Dingman c w, Peacock AC, J. Mol. Biol. 1969 (4): 139
[59] Griffth I P. Anal. Biochem, 1972 (46): 402
[60] Sun S M, Hall T C. Anal. Biochem, 1974 (61): 237
[61] Datyner A, Finnimore E D. Anal. Biochem, 1973 (55): 479
[62] Datyner A, Finnimore E D. Anal. Biochem, 1973 (52): 45
[63] Marshall T, Abbott N J, Fox P, Williams K T. Electrophoresis, 1995 (16): 28~31
[64] Vargić T, Mrša V. Electrophoresis, 1994 (15): 903~906
[65] Bath M L. Electrophoresis, 1988 (9): 148
[66] Glossmann H, Neville D M. J. Biol. Chem., 1971 (246): 6339
[67] Segrest J P, Jachson R L. in Methods in Enzymology, Academic Press, New York-London, 1972, 28~54
[68] Carpenter G H, Proctor G B, Pankhurst G L et al. Electrophoresis, 1996 (17): 91~97
[69] Beeley J A, Newman F, Wilson P H R, Shimmin I C. Electrophoresis, 1996 (17): 505~506
[70] Vesterberg O, Acevedo F, Bayard C. Electrophoresis, 1995 (16): 1390~1393
[71] Findlay J B C. In Biological Membranes: A Practical Approach (ed. J. B. C. Findlay and W. H. Evans Oxford University Press, Oxford. 1987.179
[72] Matsudaira P. J. Biol. Chem., 1987 (262): 10035
[73] Findlay J B C, Geisow M. Protein Sequencing: A Practical Approach. IRL Press Ltd. Oxford. 1989
[74] Harris E, Angal S. Protein Purification: A Practical Approach. Oxford University Press. Oxford. 1989
[75] Bray D, Brownlee S M. Anal. Biochem, 1973 (55): 213
[76] Raison R L, Marchalonis J. J. Biochemistry, 1977 (16): 2036
[77] Elder J H, Pickett R A, Hampton J, Lerner R A. J. Biol. Chem., 1977 (252): 6510
[78] Cleveland D W, Fischer S G, Kirshner M C, Laemmli U K. J. Biol. Chem., 1977 (252): 1102
[79] Acevedo F, Marin V, Wasserman M. Electrophoresis, 1995 (16): 1394~1400
[80] Williams I G, Gratzer W B. J. Chromatogr, 1971 (57): 121
[81] Panyim S, Thitipongpanich R, Supatimusro D. Anal. Biochem., 1977 (81): 320
[82] Schick M. Anal. Biochem., 1975 (63): 345
[83] Hearing V J, Klingler W G, Ekel, T M, M P M. Anal. Biochem., 1976 (72): 113
[84] Alfageme C R, Zweidler A, Mahowald A, Cohen L H J. Biol. Chem., 1974 (249): 3729
[85] Bonner W M, West M H P, Stedman J D. Eur. J. Biochem., 1980 (109): 17
[86] Helenius A, Simons K. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 1977 (74): 529
[87] Clarke S. J. Biol. Chem., 1975 (250): 5459
[88] Lane L C. Anal. Biochem., 1978 (86): 655
[89] 郭尧君，李辛晖，方勇．生物化学与生物物理进展，1997 (24): 268~271
[90] Guo Y J, Li X H, Fang Y. Electrophoresis, 1998 (19): 1311~1314
[91] 郭尧君，闻弢．生物化学与生物物理进展，1994 (21): 265~266

[92] Amersham Bio-sciences 公司 2004 年目录，387
[93] Hager D A，Burgess R R．Anal．Biochem.，1980（109）：76
[94] Manrow R E，Dottin R P．Anal．Biochem.，1982（120）：181
[95] Dottin R P，Manrow R E，Fishel B R．Aukerman S I，Culleton J L．In Me thods in Enzymology，（ed. R．Wu），Academic Press．New York．1979.68，513
[96] Hjerten S．Biochem．Biophys．Acta.，1983（736）：130
[97] Manrow R E，Dottin R P．Proc．Natl．Acad．Sci.，USA．1980（77）：730
[98] Weber K，Kuter D J．J．Biol．Chem.，1971（246）：4505
[99] Konigsberg W H，Henderson H．In Methods in Enzymology，Academic Press，New York．1983.91，254
[100] Vinogradov S N，Kapp O H．In Methods in Enzymology，Academic Press，New York．1983.91，259



第 6 章　载体两性电解质 pH 梯度等电聚焦

等电聚焦（isoelectrofocusing），缩写为 IEF 或 EF，是 60 年代建立起来的一种蛋白质分离分析手段。30 多年来发展很快，成为当前电泳中具有最高分辨率的技术。它的基本原理是利用蛋白质分子或其他两性分子的等电点的不同，在一个稳定的、连续的、线性 pH 梯度中进行蛋白质的分离和分析。所以利用等电聚焦技术分析的对象只限于蛋白质和两性分子。分析的条件是凝胶中有稳定的、连续的和线性的 pH 梯度。根据建立 pH 梯度原理的不同，梯度又分为载体两性电解质 pH 梯度（carrier ampholytes pH gradients）和固相 pH 梯度（immobilized pH gradients）。前者是在电场中通过两性缓冲离子建立 pH 梯度，后者是将缓冲基团成为凝胶介质的一部分，分辨率比前者高一个数量级。本章将详述前一种方法。

6.1　原　　理

6.1.1　蛋白质的等电点

如 4.1.1 节所述，以电泳观点看，蛋白质最主要的特性是它的带电行为。它们在不同的 pH 环境中带不同数量的正电或负电，只在某一 pH 时，蛋白质的净电荷为零。此 pH 即为该蛋白质的等电点（isoelectric point，pI）。蛋白质的等电点仅仅决定于它的氨基酸组成，是一个物理化学常数。每一个蛋白质或多肽是由不同数目和比例的氨基酸组成的，因此蛋白质的等电点范围很宽，一种 α-酸性糖蛋白（chimpanzee）的 pI 可低达 1.8，而人胎盘溶菌酶的 pI 可高达 11.7，这样宽广的 pI 范围使得可以利用它来进行蛋白质的分离和分析。载体两性电解质 pH

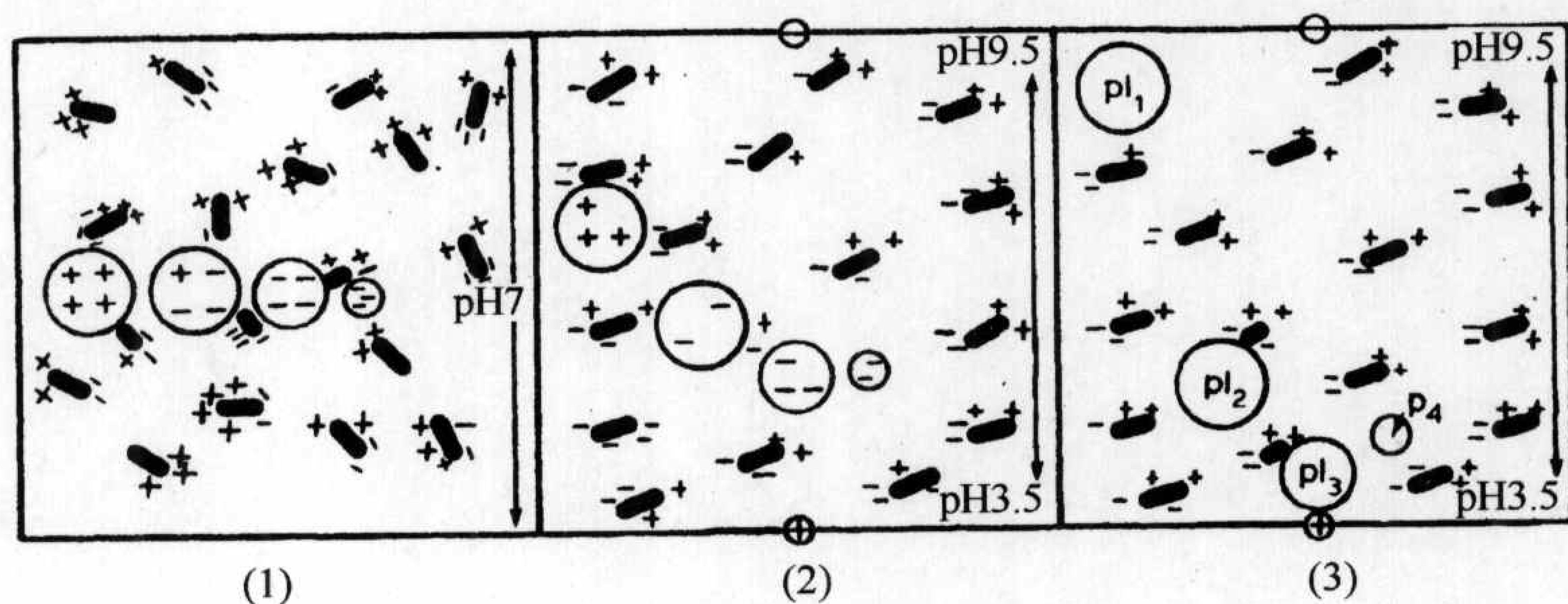


图 6.1　蛋白质分子在载体两性电解质 pH 梯度中的分离[1]

(1) 通电前；(2) 通电，开始形成 pH 梯度；(3) pH 梯度形成，蛋白质分子分离，到达等电点位置

梯度等电聚焦就是在支持介质中放入载体两性电解质，通以直流电后在两极之间形成稳定、连续和线性的 pH 梯度。当带电的蛋白质分子进入此体系时便迁移并聚焦于相应的等电点位置。因此，等电聚焦的原理是依照等电点的不同将蛋白质分子分离。反之，根据蛋白带在 pH 梯度中的位置可测得该蛋白质的等电点。见图 6.1[1]。

6.1.2 等电聚焦——在 pH 梯度中的电泳

在常规聚丙烯酰胺凝胶电泳中，分离通常是在恒定的缓冲系统中进行的。如图 6.2（左），假定缓冲液的 pH 是 9，根据净电荷-pH曲线（滴定曲线），蛋白质 A 和 B 将分别有净电荷 −3 和 −1。当这些带负电的蛋白质被放在靠近电泳系统的阴极时，它们将在电场的影响下向阳极迁移。带负电荷多的蛋白质 A 将受到阳极较大的吸引力而逐渐跑到蛋白质 B 的前面而与蛋白质 B 分开。假定蛋白质 A 和 B 的大小和形状相同，它们将仅仅由于净电荷的不同而分开，但实际上如 4.1.1 节所述，这种分离是基于净电荷、分子大小和形状三者因素的综合。由于它是在恒定缓冲系统中分离，很易扩散，为此样品必须被加成一个窄带，否则在电泳过程中蛋白带会变宽而影响分离。特别是对于带电差别很小的组分的分离，其分辨率是一个应被考虑的问题。

在等电聚焦中，分离是在连续的，稳定的和线性的 pH 梯度中进行的。如果把蛋白质 A 和 B 的混合物放在 pH3.5～pH10 的梯度中 pH 6 的位置（图 6.2 右），根据滴定曲线，蛋白质 A 将有净电荷 −2，蛋白质 B 将有净电荷 +2。加上电场后，它们分别向不同的方向迁移。A 向阳极，B 向阴极。在迁移过程中，蛋

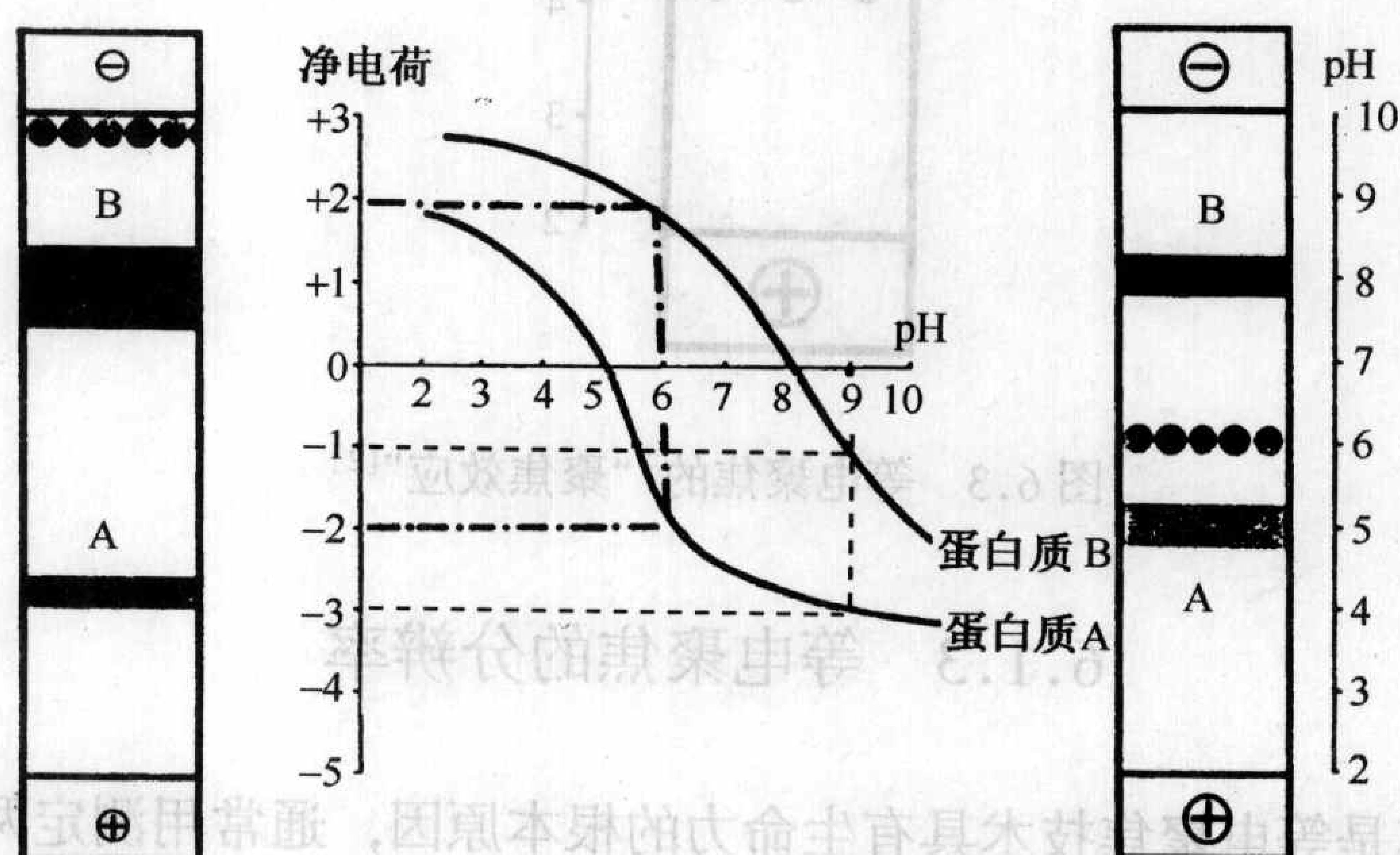


图 6.2 常规聚丙烯酰胺凝胶电泳（-----）（左）
和等电聚焦电泳（−·−·−·−）（右）原理的区别[2]

白质 A 将进入越来越低的 pH 范围，并将逐渐损失它的负电荷，当它达到 pH 是 5 的梯度位置时，它的净电荷为零，即停止迁移，这就是它的 pI 位置。与此同时，蛋白质 B 将向越来越高的 pH 范围迁移，直到到达它的净电荷是零的 pH 梯度位置，这就是蛋白质 B 的等电点位置。

在等电聚焦中，分离仅仅决定于蛋白质的等电点，这是一个“稳态”过程。一旦蛋白质到达它的等电点位置，没有净电荷，就不能进一步迁移。如果蛋白带向阴极扩散，则将进入高 pH 范围而带负电，阳极就将吸引它回去，直到它回到净电荷是零的位置。如果它向阳极扩散，则将带正电，阴极将吸引它回去，直到它回到净电荷是零的位置。因此蛋白质只能在它的等电点位置被聚焦成一条窄而稳定的带，见图 6.3。所以等电聚焦的分辨率大大高于上述的常规聚丙烯酰胺凝胶电泳。这种“聚焦效应”或称“浓缩效应”是等电聚焦最大的优点，是高分辨的保证。

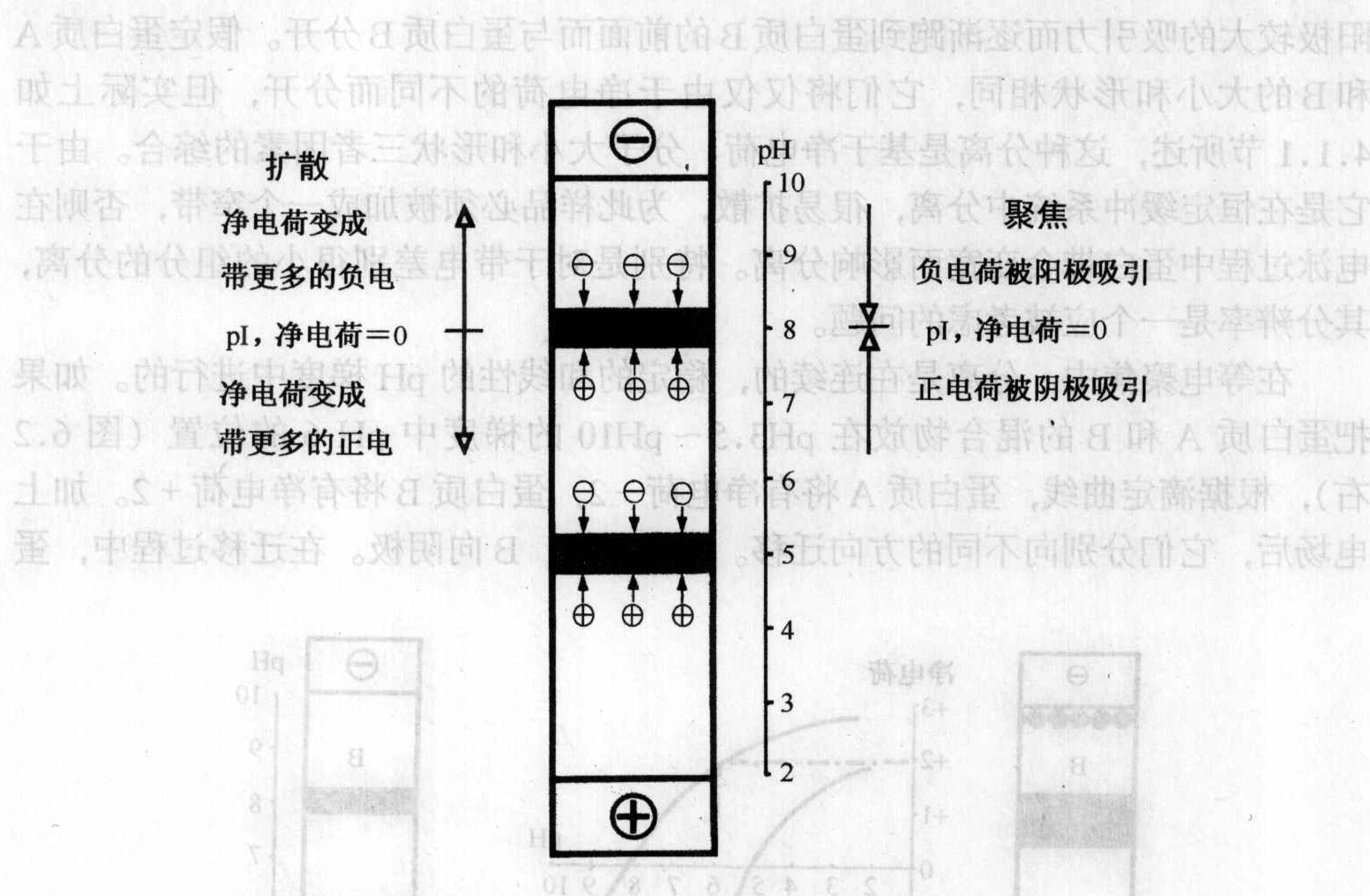


图 6.3　等电聚焦的“聚焦效应”[2]

6.1.3　等电聚焦的分辨率

高分辨率是等电聚焦技术具有生命力的根本原因，通常用测定两个邻近带的 pI 差，Δ（pI）来表示分辨率[3]：

$$\Delta(\mathrm{pI}) = 3\sqrt{\frac{D[\mathrm{d(pH)/d}x]}{E[-\mathrm{d}u/\mathrm{d(pH)}]}}$$

这里 D 为蛋白质的扩散系数，E 为场强，d(pH)/dx 为 pH 梯度，du/d(pH)为蛋白质的迁移率的斜率。D 和 du/d(pH)是常数，所以只有通过提高场强和使用窄 pH 范围来提高分辨率。但场强的提高受到一定的限制。因为过高的电压在电泳时产生的热会引起热对流，蛋白变性，甚至烧胶。pH 梯度范围对分辨率的影响在图 6.4 中示出，在宽 pH 范围，样品的 A、B 和 C 有重叠，但在窄 pH 范围，分辨率明显提高。

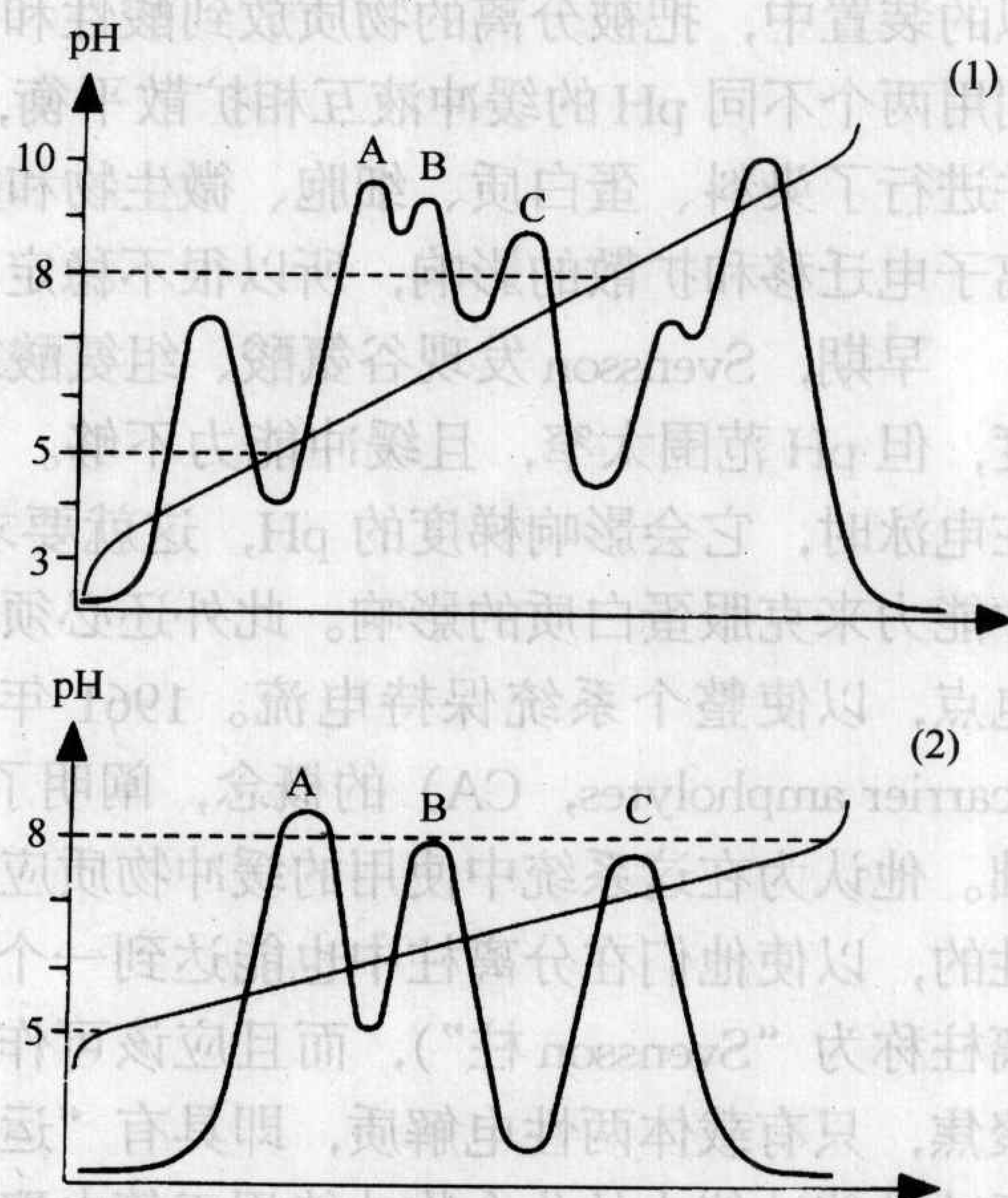


图 6.4 pH 梯度范围对分辨率的影响
(1) 宽 pH 范围；(2) 窄 pH 范围[2]

大多数情况下，使用载体两性电解质的等电聚焦技术达到0.02 pH的分辨率并不困难[4]，使用窄 pH 范围时，甚至可达到0.0025 pH和 0.001 pH[5]。

6.2 载体两性电解质和 pH 梯度的形成

6.2.1 历 史

任何一种技术的诞生都孕育着一段历史，就像电泳技术的开创归功于 Tiselius 教授和他的导师 Svedbery 一样，等电聚焦技术的建立应归功于 Svensson 教授（1968 年改姓为 Rilbe）和他的学生 Vesterberg（瑞典真是一个电泳杰出科学家辈出的王国！）。Reghetti 教授在他的著作“*Isoelectric focusing: theory, methology and application*”一书的“前言”和“历史”中详细而生动地记述了这段鲜为人知的故事[6]。

等电聚焦技术的关键在于 pH 梯度的建立，所以载体两性电解质合成的历史就是等电聚焦技术的历史。早在 1912 年，两位日本科学家[7]在一个用膜隔开的，并在阳，阴极之间，按 pI 值的增加而排列起来的三个腔的电解槽中将蛋白水解液电解成氨基酸。1929 年，Williams 等又设计成多槽，减少了扩散和对流，从而提高了分辨率。以后又有很多科学家对此做了各种各样的改进，但由于离子移动引起 pH 梯度的改变，限制了技术的发展。1948 年 Svensson[8]对此做了综述。50 年代，Kolin[9~12]提出了一个想法，认为聚焦离子应为一个 pH 梯度，用蔗糖密度梯度来稳定，并定名为“等电谱”（isoelectric spectrum）。他在一个 Tiselius

似的装置中，把被分离的物质放到酸性和碱性缓冲液中间的内界面处，通电后，利用两个不同 pH 的缓冲液互相扩散平衡，在其混合区间形成“人工 pH 梯度”，并进行了染料、蛋白质、细胞、微生物和病毒的分离。但这种 pH 梯度受缓冲液离子电迁移和扩散的影响，所以很不稳定。

早期，Svensson 发现谷氨酸、组氨酸或赖氨酸能产生大约 1 个 pH 单位的梯度，但 pH 范围太窄，且缓冲能力不够。因为蛋白质分子本身也是两性电解质，在电泳时，它会影响梯度的 pH，这就要求形成 pH 梯度的物质必须有足够的缓冲能力来克服蛋白质的影响。此外还必须有一个好的、均匀的导电性，特别在等电点，以使整个系统保持电流。1961 年，Svensson[13] 提出了载体两性电解质（carrier ampholytes，CA）的概念，阐明了在电场中建立一个稳定的 pH 梯度的基础。他认为在这系统中使用的缓冲物质应该具有两个基本的特性：首先应该是两性的，以使他们在分离柱中也能达到一个平衡位置（后来瑞典 LKB 公司把此分离柱称为“Svensson 柱”），而且应该可作为“载体”。两性电解质不能用于等电聚焦，只有载体两性电解质，即具有“运载”电流（好的导电性）和 pH（好的缓冲性能）能力的化合物才能用于等电聚焦。1964 年春天，Vesterberg 从斯德哥尔摩给哥德堡的 Sveasson 教授打电话，激动地报告了他成功合成载体两性电解质的消息[6]，从此开创了高分辨电泳技术的新阶段。这两位杰出的科学家为等电聚焦技术奠定了理论的和实践的基础。

6.2.2 合　　成

6.2.2.1 Ampholine 的合成（原瑞典 LKB 公司）

根据 Svensson 的理论，三年后，首先由 Vesterberg 合成了载体两性电解质，并由瑞典 LKB 公司生产，商品名为 Ampholine。其第一批号的载体两性电解质称之为“Vesterberg's carrier ampholytes”，专利号为 No. 3485736[14]。它是由许多脂肪族的多氨基多羧酸的异构体和同系物组成的，结构式如图6.5。它们有连续改变的氨基与羧基比。这种合成是将不饱和酸，如丙烯酸与多乙烯多胺发生双键的加成反应。反应先发生在 α、β 不饱和酸的 β 碳原子上，调节胺和酸的比例，就可得到氨基与羧基不同比例的脂肪族多氨基多羧酸。电解质的 pI 值将在大多数羧基的 p*K* 值和大多数氨基的 p*K* 值之间。多乙烯多胺链愈长，则仲胺对伯胺的比例增加，加成方式也愈多，所得载体两性电解质的 pI 值也越连续，就能得到平滑的 pH 梯度。调节酸与胺的比例，可得到不同 pH 范围的载体两性电解质。也可先合成宽 pH 范围的载体两性电解质，然后用电解法将其分为窄 pH 范围。图6.5 示出了原瑞典 LKB 公司的 10 种 pH 范围的载体两性电解质。其中 pH2.5～4和 pH9～11 的浓度为 20%（*W*/*V*），但缓冲能力和导电性是其余范围的 2 倍，合成方法也不同[15~17]。其他 pH 范围的浓度均为 40%（*W*/*V*）。

$—CH_2—N—(CH_2)_x—N—CH_2—$ $\quad$ R=H 或者 $—(CH_2)_x—COOH$

$(CH_2)_x$ $\quad$ $(CH_2)_x$ $\quad$ X = 2 或 3

NR_2 $\quad$ COOH



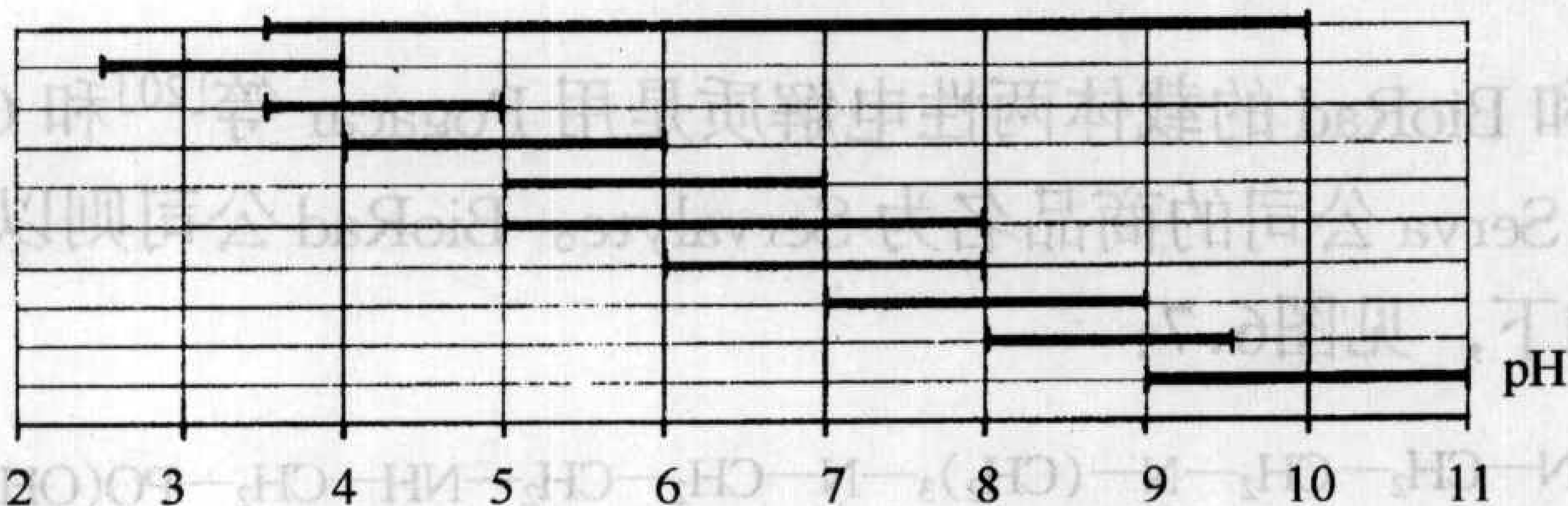


图 6.5　原瑞典 LKB 公司 Ampholine 的结构式和 pH 范围[2]

LKB 公司还生产过用于小分子质量多肽分离的，用 C^{14} 标记的 Ampholine，用于血红蛋白分离的 pH7～7.5 的 Ampholine 和用于 α_1-抗胰蛋白酶分离的 pH4～4.5 的 Ampholine。1980～1981 年，作者还参与了 4 种 pH 范围预混合 Ampholine 的研制，即 Ampholine，preblended pH2.5～4.5，pH4～6.5，pH5～8，pH3.5～9.5。Ampholine，preblended 比非预混合的 Ampholine 有更线性的 pH 梯度。尽管瑞典 LKB 公司已不存在，但由于它的质量及声誉，至今 GE 医疗集团，安玛西亚公司还保留其产品。

6.2.2.2　Pharmalyte 的合成（原瑞典 Pharmacia 公司）

Pharmalyte 是原瑞典 Pharmacia 公司的载体两性电解质的商品名，见图 6.6。它是根据Williams 等[18]和 Söderberg 等[19]的新的想法合成的，含有 6 个氨基，结构式中的R是亲水基团。这种合成方法与前述的二种方法相反，它是通过混

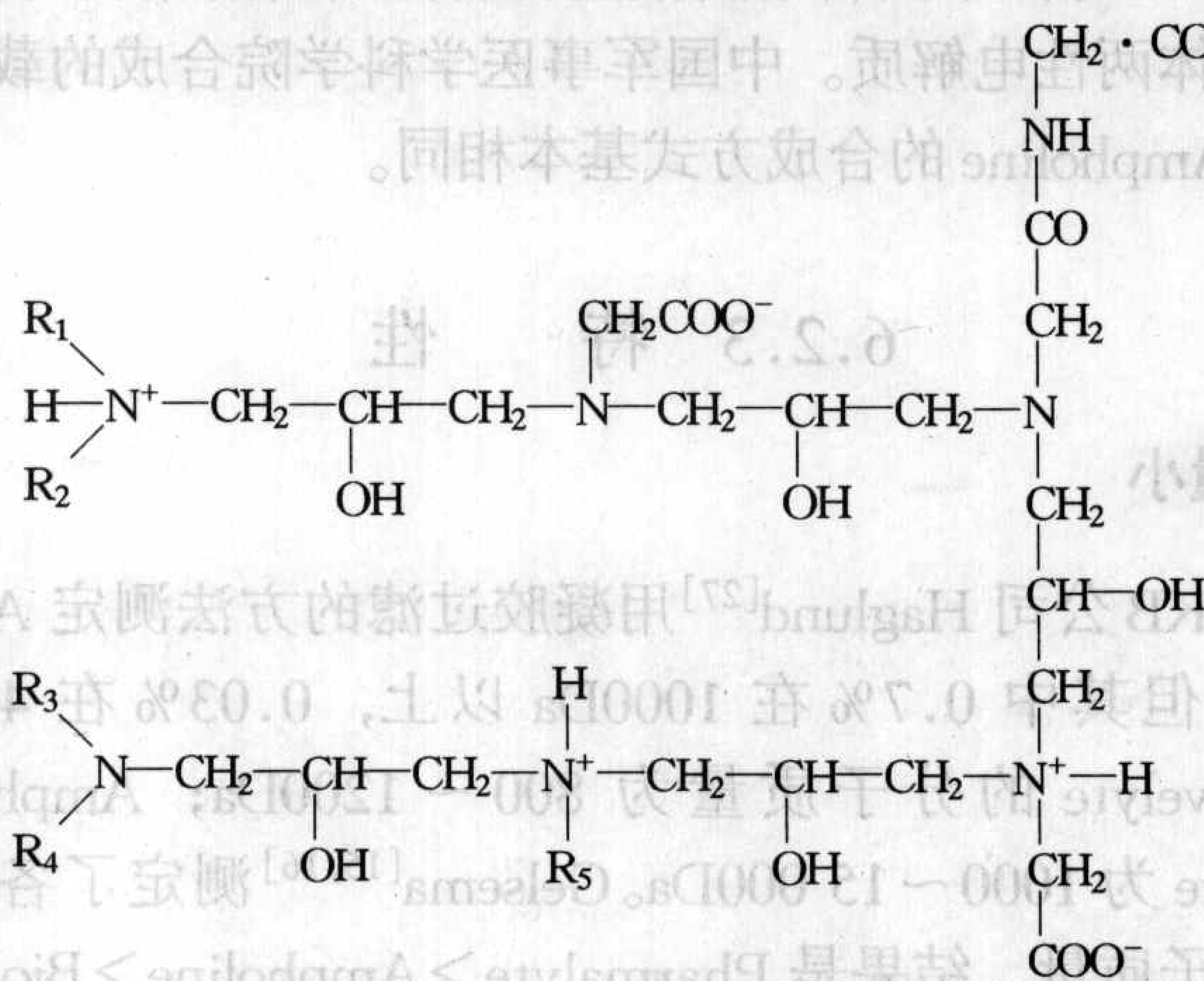


图 6.6　原瑞典 Pharmacia 公司的 Pharmalyte 的结构式

合窄 pH 范围的载体两性电解质来得到宽的 pH 范围。现在 Pharmalyte 共有 9 种 pH 范围：pH3～10；2.5～5；4～5；5～8；8～10.5；4.2～4.9；4.5～5.4；5～6；6.7～7.7。由于 20 年来公司的各种变迁，现在 Ampholine 和 Pharmalyte 均为 GE 医疗集团，安玛西亚公司生产。

6.2.2.3 Servalyte 的合成（德国 Serva 公司）

Serva 公司和 BioRad 的载体两性电解质是用 Pogacar 等[20]和 Grubhofer 等[21]的方法合成的，Serva 公司的商品名为 Servalyte。BioRad 公司则以 Biolyte 作为商品名。结构式如下，见图6.7：

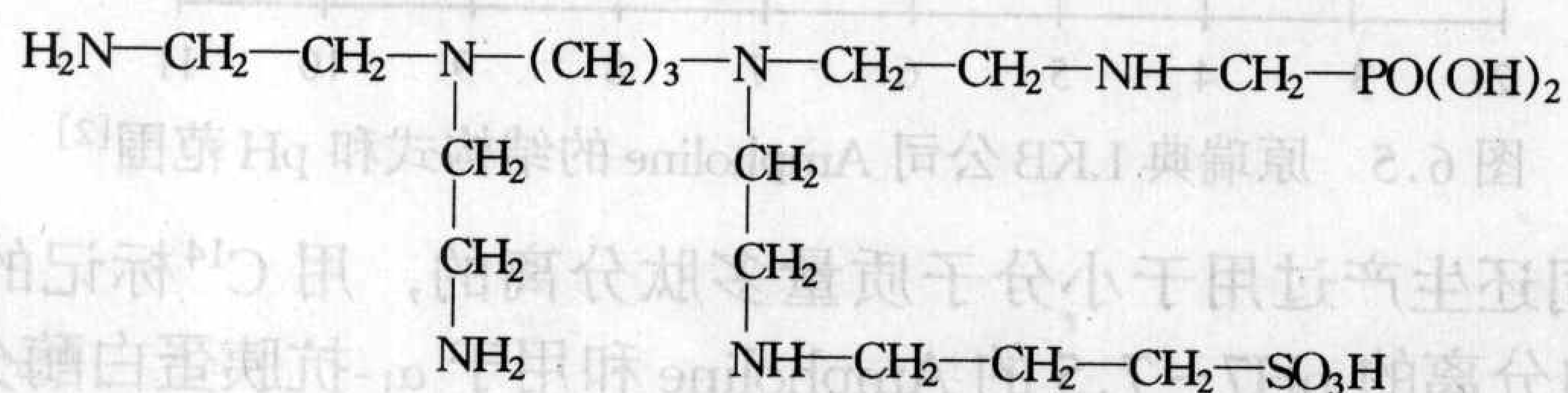


图 6.7 Servalyte 和 Biolyte 的结构式

它是在丙烯乙胺与乙烯亚胺缩合并蒸馏得到的多胺混合物中再引入磺酸基团或磷酸基团后合成的。Serva 公司提供的 pH 范围有 2～4；3～5；4～6；5～7；6～8；7～9；9～11；2～11 及 3～10 等 9 种。BioRad 公司的 Biolyte 有 8 种 pH 范围，它们是 pH3～10；3～5；4～6；5～7；5～8；6～8；7～9；8～10。

6.2.2.4 实验室合成

根据 Svesson 提出的原理，除了上述几个大公司合成以外，实际上有很多实验室也用不同方法进行了合成，如 Vinogradov-Righetti 方法[22]，Charlionet 方法[23,24]，Just 方法[25]等，中国科学院微生物研究所的酶结构与功能研究组[26]在国内最早合成了载体两性电解质。中国军事医学科学院合成的载体两性电解质与原瑞典 LKB 公司 Ampholine 的合成方式基本相同。

6.2.3 特　　性

6.2.3.1 分子质量小

1975 年瑞典 LKB 公司 Haglund[27]用凝胶过滤的方法测定 Ampholine 的分子质量约为 700Da，但其中 0.7% 在 1000Da 以上，0.03% 在 4000Da 左右。但 Radola[28]测得 Servelyte 的分子质量为 800～1200Da；Ampholine 为 1000～6000Da，Pharmalyte 为 1000～15 000Da。Gelsema[15,16]测定了各种 pH 范围的载体两性电解质的分子质量，结果是 Pharmalyte＞Ampholine＞Biolyte 和 Servalyte，且酸性范围的分子质量高于碱性范围。Bianchi Bosisio[17]测定了各种窄 pH 范围

Ampholine的分子质量。见图6.8。可能是由于测定方法的不同，报道结果不尽相同。

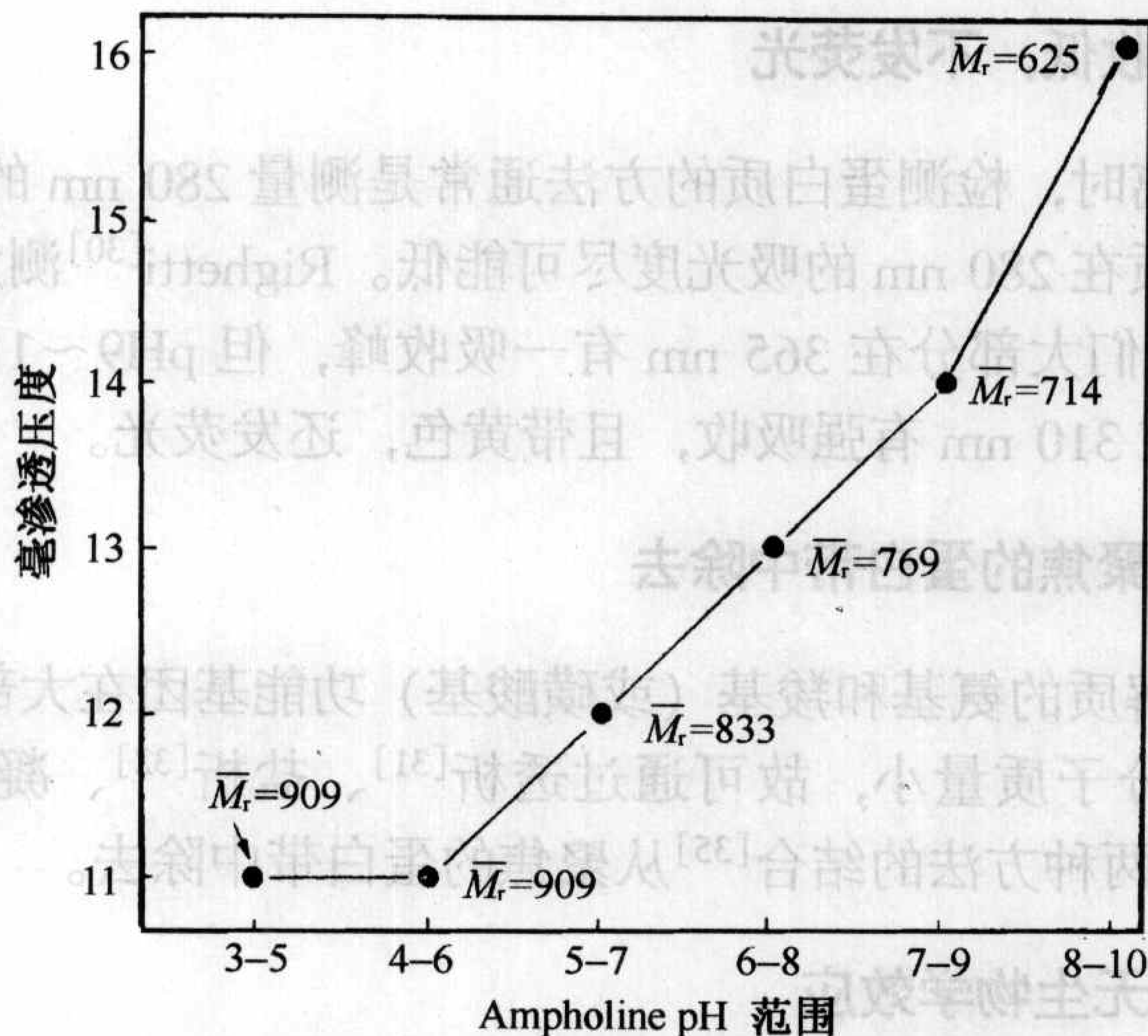


图6.8 各种窄pH范围Ampholine的分子质量[17]

6.2.3.2 可溶性好

为了保证等电聚焦过程中pH梯度的形成和蛋白样品的迁移，载体两性电解质必须有很好的溶解性能，它在不同溶剂中的溶解度见表6.1。

表6.1 2% Ampholine（pH3.5～10）在不同溶剂中的溶解度[29]

溶剂	溶解极限（22℃）	溶剂	溶解极限（22℃）
磺基水杨酸	5%（W/V）*	乙醇	70%（V/V）
三氯醋酸	50%（W/V）*	二甲亚砜	65%（V/V）
苦味酸	在0.6%时，有严重的沉淀（W/V）	二甲基甲酰胺	55%（V/V）
硫酸铵	100%（W/V）	异丙醇	50%（V/V）
氯醛合水	100%（V/V）	四甲基尿素	45%（V/V）
甲酰胺	100%（V/V）		

* 未做高于这个溶解度的试验。

6.2.3.3 缓冲能力强

为了避免聚焦的蛋白质在等电点引起pH梯度的局部改变和溶解性能的下降，载体两性电解质必须具有强的缓冲能力和可溶性。

6.2.3.4 导电性均匀

良好和均匀的导电性是等电聚焦所必需的。载体两性电解质电导的不均匀会

引起电场的不均匀，从而导致凝胶局部过热，这不仅会影响 pH 梯度的稳定，而且会使蛋白质产生热变性，甚至将凝胶烧坏。

6.2.3.5 紫外吸收低，不发荧光

由于制备分离时，检测蛋白质的方法通常是测量 280 nm 的吸光度，因此要求载体两性电解质在 280 nm 的吸光度尽可能低。Righetti[30]测定了不同 pH 范围的 Ampholine，它们大部分在 365 nm 有一吸收峰，但 pH9～11 的吸收峰在 290 nm，pH3.5～5 在 310 nm 有强吸收，且带黄色，还发荧光。

6.2.3.6 容易从聚焦的蛋白带中除去

载体两性电解质的氨基和羧基（或磺酸基）功能基团在大部分情况下与蛋白质可逆结合，且分子质量小，故可通过透析[31]、盐析[32]、凝胶过滤[33]、离子交换[34]等方法或两种方法的结合[35]从聚焦的蛋白带中除去。

6.2.3.7 无毒、无生物学效应

载体两性电解质对哺乳动物的组织培养，酶活性测定，免疫检测或当注射到小白鼠或大白兔中都没有影响。

6.2.3.8 螯合性质

金属离子通常可和载体两性电解质相邻的氮功能基团发生螯合作用，这种螯合作用最易发生在 pH8.5～10.5 的范围内，因为此时大多数氮功能基团是被质子化的[36]。除 Cu^{2+} 以外，载体两性电解质对其他二阶阳离子，如 Mg^{2+}、Ca^{2+}、Zn^{2+} 等的螯合能力比 EDTA 要弱 100～500 倍[37]。

为了减少螯合作用，应先将凝胶进行预聚焦，然后将样品加在靠近预期的等电点附近。但大多由金属螯合作用造成的酶活力下降是可逆的，因此可在等电聚焦后，用合适的方法恢复酶活力。

6.2.4 pH 梯度的形成

在没有电场时，载体两性电解质溶液的 pH 值大约是该溶液 pH 范围的平均值。所有的载体两性电解质分子都荷电，只是在溶液中荷正电和荷负电的基团数目是相等的，所以总的净电荷将是零，见图 6.9（1）。当引入电场时，载体两性电解质分子将向阴极或阳极迁移，带有最低等电点的分子（荷最多的负电）将最快地向阳极迁移。当它达到净电荷是零的位置时才停止。这个位置靠近阳极，由于它有高的缓冲能力，使环境溶液的 pH 等于分子本身的 pI。其次一些低 pI 的载体两性电解质分子（荷其次多的负电）也将向阳极移动，直到它的净电荷被减

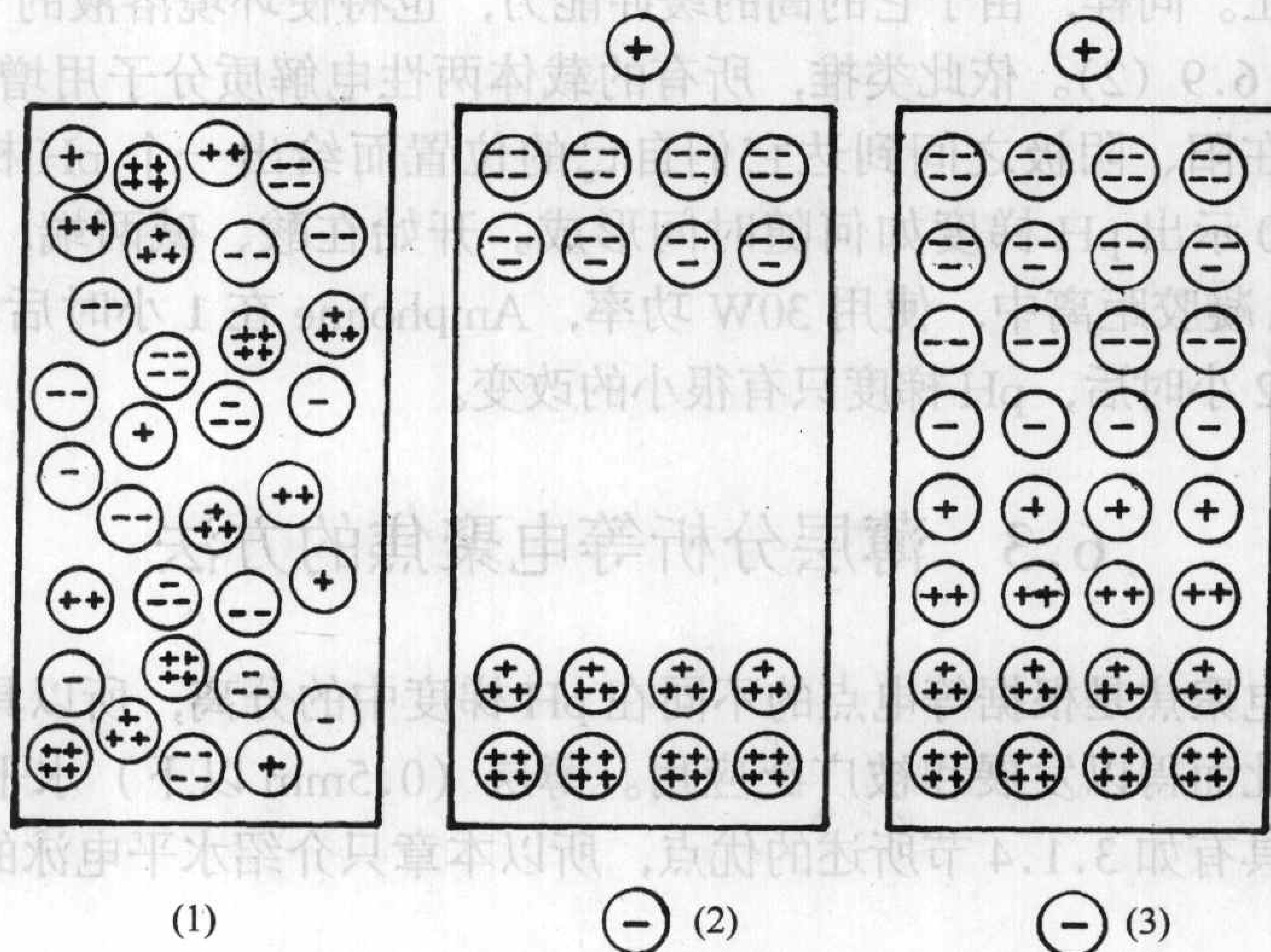


图 6.9　载体两性电解质在电场中形成 pH 梯度的模式图

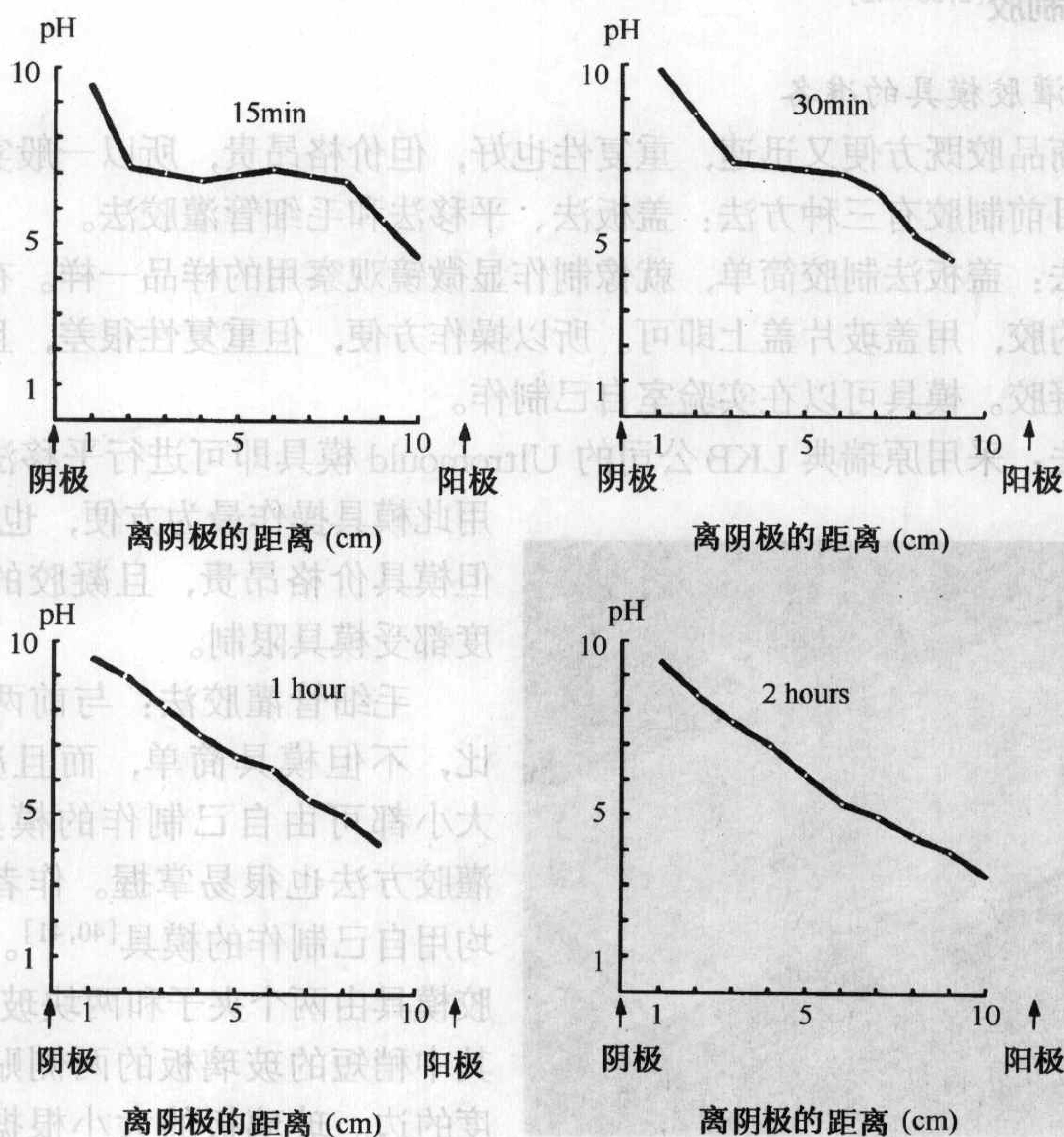


图 6.10　Ampholine pH 梯度的形成[38]

少到零才停止。同样，由于它的高的缓冲能力，也将使环境溶液的 pH 等于它本身的 pI 见图 6.9（2）。依此类推，所有的载体两性电解质分子用增加 pI 级数的办法将分别在阳、阴极之间到达它们自己的位置而给出一个 pH 梯度见图 6.9（3）。图 6.10 示出 pH 梯度如何随时间形成。开始在酸、碱两端，然后移向中间。在 12cm 凝胶距离中，使用 30W 功率，Ampholine 在 1 小时后，pH 梯度完全形成。在 2 小时后，pH 梯度只有很小的改变。

6.3 薄层分析等电聚焦的方法

由于等电聚焦是根据等电点的不同在 pH 梯度中的分离，所以具有很高的分辨率，也因此而得以发展和被广泛应用。薄层（0.5mm 以下）水平分析等电聚焦更由于其具有如 3.1.4 节所述的优点，所以本章只介绍水平电泳的方法。

6.3.1 聚丙烯酰胺凝胶等电聚焦

6.3.1.1 制胶[2,38~42]

（1）*灌胶模具的准备*

使用商品胶既方便又迅速，重复性也好，但价格昂贵，所以一般实验室均自己制胶。目前制胶有三种方法：盖板法、平移法和毛细管灌胶法。

盖板法：盖板法制胶简单，就像制作显微镜观察用的样品一样。在载玻片上倒一定量的胶，用盖玻片盖上即可。所以操作方便，但重复性很差，且不宜制作大尺寸的凝胶。模具可以在实验室自己制作。

平移法：采用原瑞典 LKB 公司的 Ultromould 模具即可进行平移法灌胶，使用此模具操作最为方便，也极易成功，但模具价格昂贵，且凝胶的大小和厚度都受模具限制。

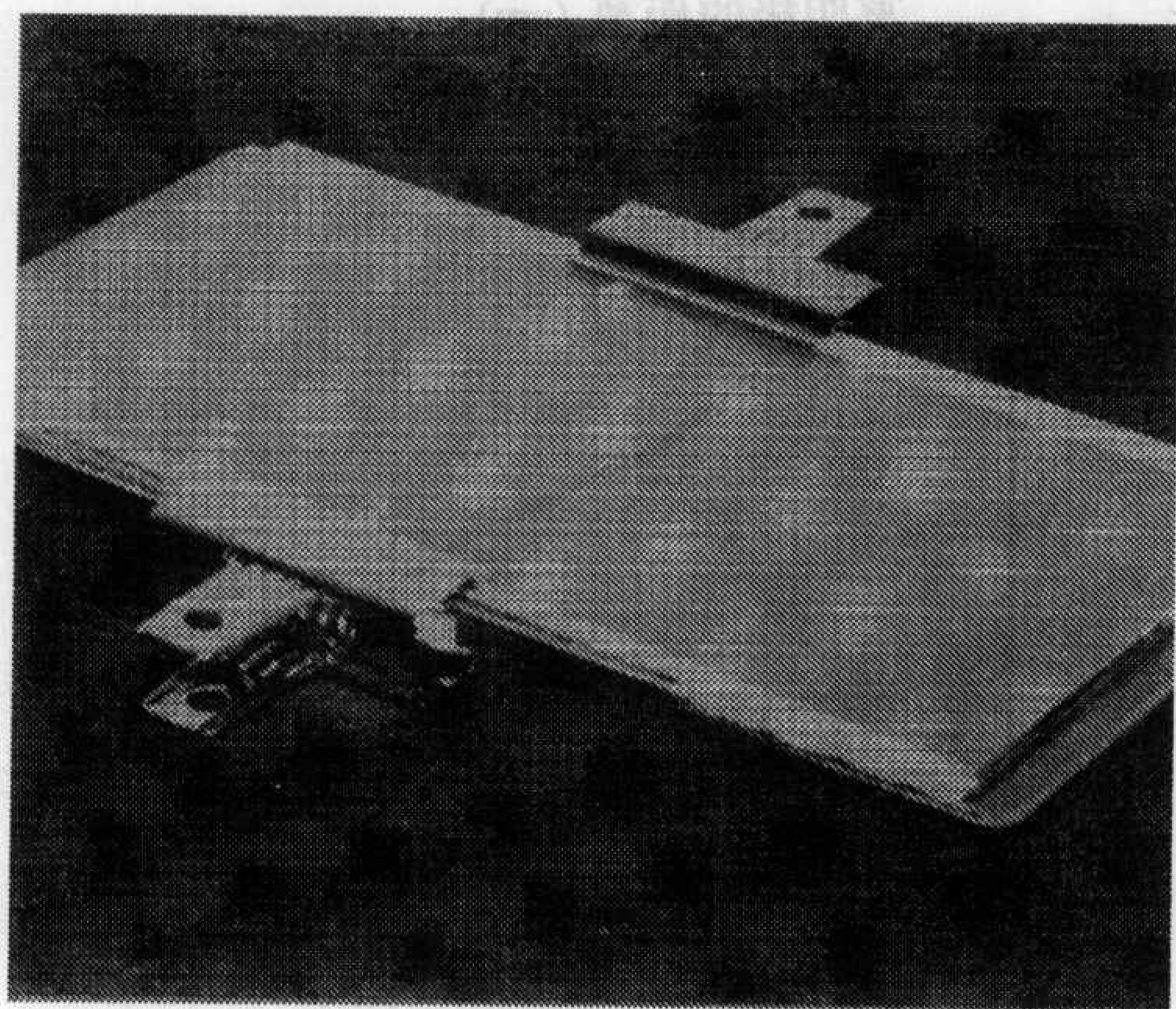


图 6.11　毛细管法灌胶模具[39]

毛细管灌胶法：与前两种方法相比，不但模具简单，而且凝胶厚度、大小都可由自己制作的模具来控制，灌胶方法也很易掌握。作者实验室现均用自己制作的模具[40,41]。毛细管灌胶模具由两个夹子和两块玻璃板组成。其中稍短的玻璃板的两侧贴有一定厚度的边。玻璃板的大小根据欲制凝胶的大小而定。

在洁净，带边的短玻璃板上倒少

许疏水硅烷，用软纸或棉花在玻璃板上涂布均匀。在不带边的长玻璃板上放一块塑料支持膜，使膜紧贴玻璃。也可用1mm厚的平整玻璃或用浸湿的玻璃纸替代。盖上带边的短玻璃板，在玻璃板的带边侧分别用夹子夹紧。组装好的模具（见图6.11）水平放置，准备灌胶。

（2）溶液配制

丙烯酰胺单体贮液：溶解14.55g丙烯酰胺和0.45g *N*，*N′*-甲叉双丙烯酰胺在35ml蒸馏水中，搅拌，直至溶解，用蒸馏水加至50ml。过滤，溶液可在4℃保存两周。

10%（*W*/*V*）过硫酸铵贮液：溶解0.1g过硫酸铵在1ml蒸馏水中，溶液必须新鲜配制。

见表6.2。

表6.2　凝胶贮液的配制[38, 39]

凝胶浓度与交联度	$T=5\%$　$C=3\%$	$T=7.5\%$　$C=3\%$
单体贮液（ml）	2.5	3.75
40%载体两性电解质（ml）	0.9	0.9
双蒸水（ml）	11.5	10.25
将上述溶液置于抽滤瓶中抽气5～10分钟		
10%过硫酸铵（μl）	75	75
TEMED　（μl）	8	8

注：①凝胶溶液应先抽气，过硫酸铵应在即将灌胶前加。
②溶液体积视凝胶大小按比例增减。载体两性电解质的量按凝胶厚薄适量减增。
③过硫酸铵和TEMED的量视聚合情况增减。
④$T=5\%$、$C=3\%$的凝胶适合于分析分子质量小于30万的样品，$T=7.5\%$，$C=3\%$的凝胶适合于分析分子质量小于10万的样品。
⑤此凝胶贮液的配方不适合于pH小于5的酸性凝胶，酸性凝胶配方参见表6.9。

（3）灌胶和取胶

用带有橡皮管的注射器吸取抽滤瓶中的溶液，从模具的一端均匀缓慢地注入模具的玻璃板之间。为防止凝胶溶液洒在实验台上，也可将模具放在盘中，见图6.12。

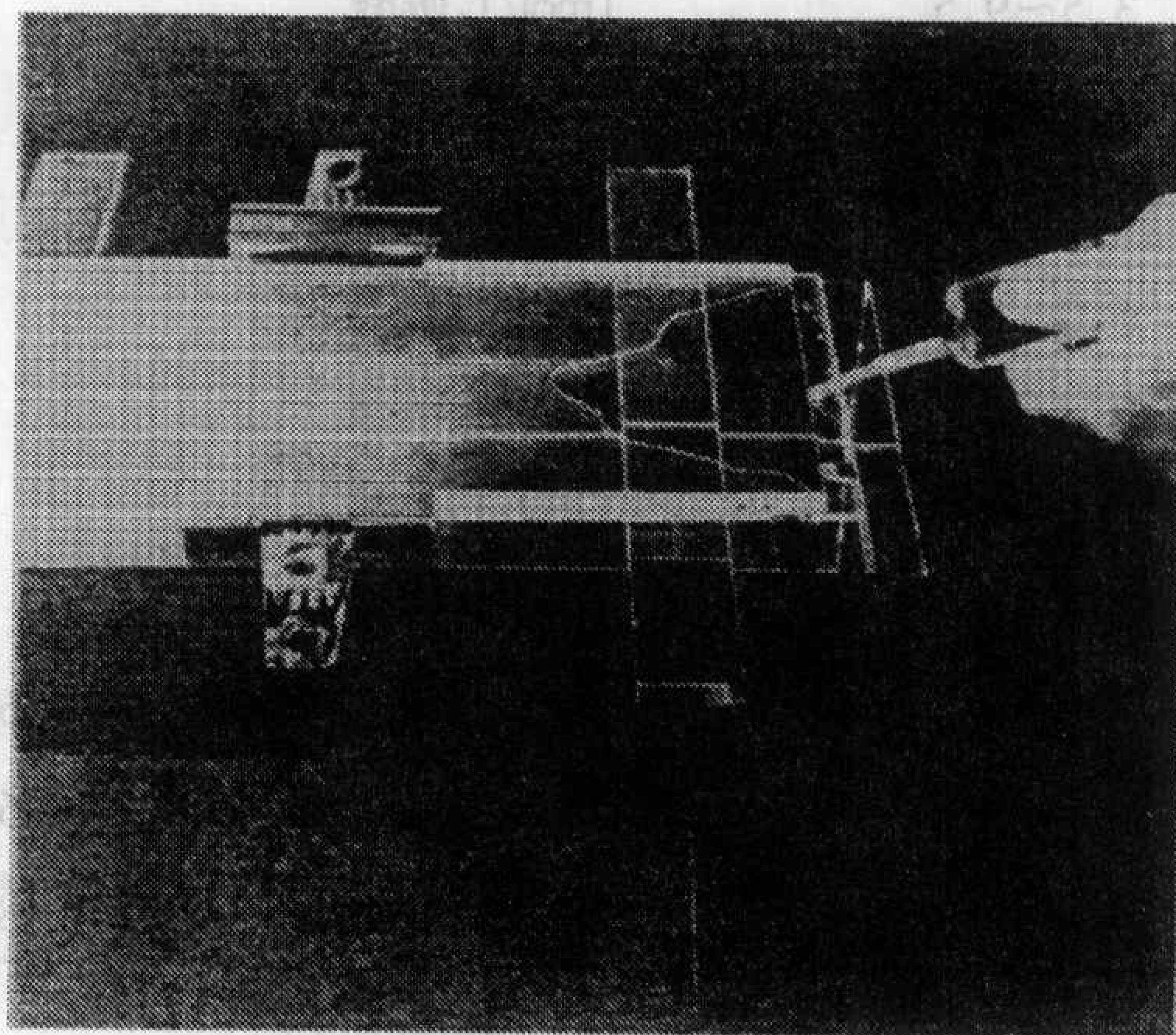


图6.12　毛细管法灌胶

凝胶聚合约需40分钟～1小时。聚合后，可在模具的带边侧看到光的折射，即可取胶。将一薄刀插入底层玻璃板和塑料支持膜之间，见图6.13，轻轻地撬一下，底层玻璃和塑料支持膜随即分开。小心地用薄刀先

沿玻璃板的边缘从玻璃板上将凝胶剥离，然后剥开带有支持膜的整张凝胶。聚合后的凝胶可立即使用，也可保存在4℃冰箱中备用，但需保持一定的湿度。

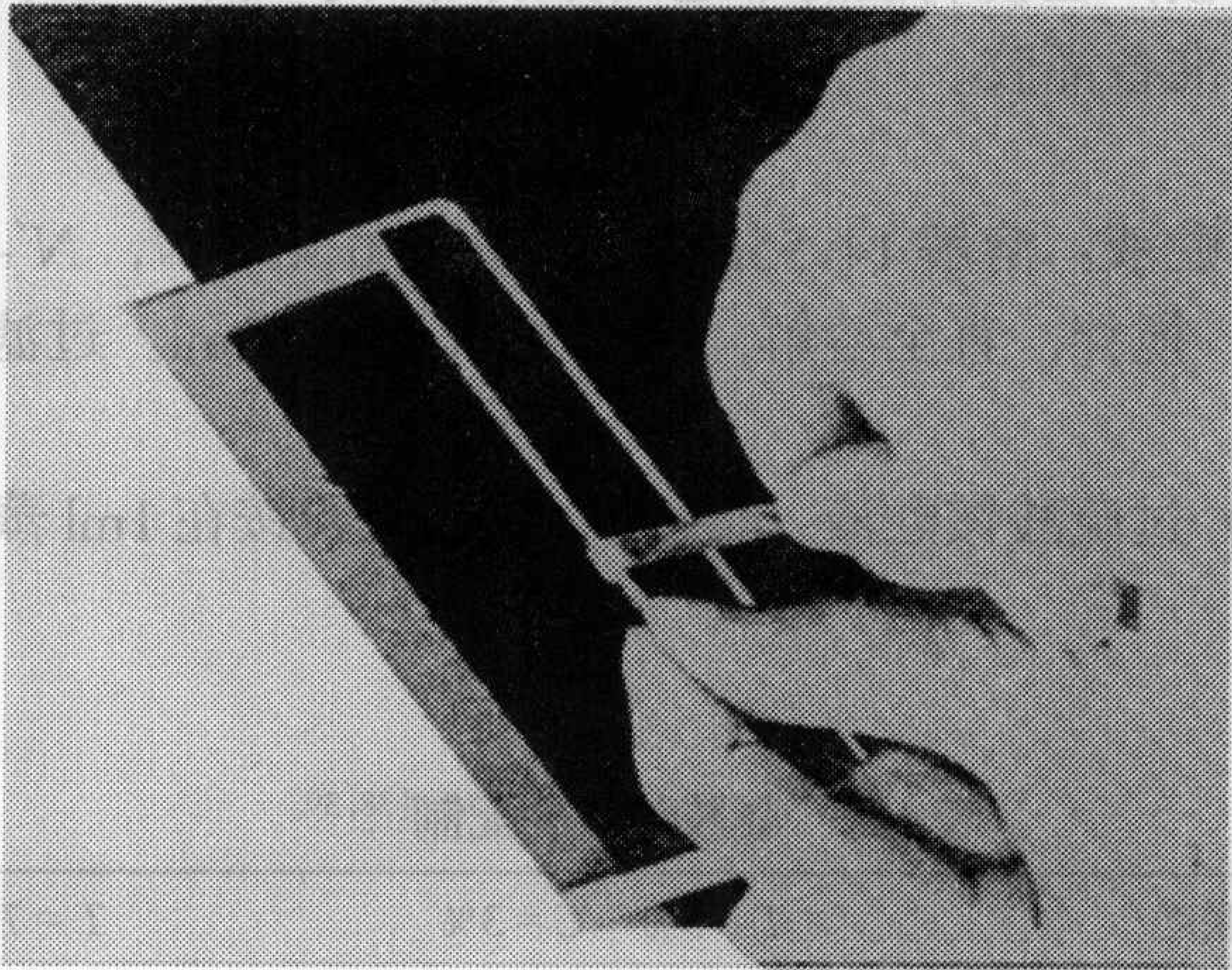


图6.13　将薄刀插入底层玻璃板和塑料支持膜之间轻轻地撬一下[39]

6.3.1.2　等电聚焦[2,38~42]

打开循环水浴，设置冷却温度。一般为4～15℃，视室温而定。室温低时，采用低一些的冷却温度。反之，室温高时或系统中有尿素时，采用高一些的冷却温度。将制好的聚丙烯酰胺凝胶铺在冷却板上，其间涂以液体石蜡或煤油并避免气泡陷入，以保证胶板和冷却板之间的良好接触。

表6.3　电极溶液

pH范围	阳极	阴极
3.5～9.5	1mol/L磷酸	1mol/L氢氧化钠
2.5～4.5	1mol/L磷酸	0.4mol/L HEPES
4.0～6.5	0.5mol/L醋酸	0.5mol/L氢氧化钠
5.0～8.0	0.5mol/L醋酸	0.5mol/L氢氧化钠
2.5～4.0	1mol/L磷酸	2%载体两性电解质pH6～8
3.5～5.2	1mol/L磷酸	2%载体两性电解质pH5～7
4.5～7	1mol/L磷酸	1mol/L氢氧化钠
5.5～7.7	2%载体两性电解质pH4～6	1mol/L氢氧化钠
6～8.5	2%载体两性电解质pH4～6	1mol/L氢氧化钠
7.8～10	2%载体两性电解质pH4～8	1mol/L氢氧化钠

用合适的电极溶液润湿滤纸电极条。不同 pH 范围的阳、阴极电极溶液可按表 6.3 选用。在凝胶两侧分别放置阳、阴极滤纸条。有的仪器采用粗电极与凝胶直接接触的方式，则不需加滤纸电极条。

按冷却板上的格子和预先设计的实验计划将样品加在凝胶上。微量样品 ($<3\mu l$) 可直接加在凝胶上，稀样品加在加样滤纸上，等电点标准加在两侧或中间。根据等电聚焦的原理，样品可加在凝胶上任何合适的位置，浓度一般为 $0.5\sim2\mu g/\mu L$。

将电极分别放在滤纸电极条的中心，再将阳极和阴极分别与电源的正、负极相连。接通电源。电参数参见表 6.4。注意确保电极和电极条的良好接触。电泳半小时后，去掉加样滤纸。对容易变性的样品，先进行 15～30 分钟的预聚焦，再加样。

表 6.4　电参数（冷却温度为 +10℃ 或视室温而定）[38～39]

pH 范围	3.5～9.5	2.5～4.5	4.0～6.5	5.0～8.0
上限电压（V）	2000	1500	2000	2000
上限电流（mA）	50	25	25	50
上限功率（W）	25	15	25	25

注：本表参数适合于 126mm×250mm×0.5mm 的 Ampholine 凝胶。电压与功率的设置取决于试剂质量和电极间凝胶的距离，电流与功率的设置取决于凝胶的长度和加样数。

6.3.1.3　pH 梯度测定[2,38,39]

pH 梯度测定有三种方法。

1）早期测定 pH 梯度的方法，特别是使用圆盘电泳时，是将切成一段段的凝胶浸泡在蒸馏水中（或 10 mmol/L 氯化钾中），然后测定浸泡液的 pH。

2）聚焦后，可用表面电极测 pH，按照冷却板上的格子从阴极到阳极每隔 1cm 测一值。为防止聚焦带的扩散，测 pH 后，再重新聚焦 5～10 分钟。然后在凝胶扫描仪，摄录系统或坐标纸上画 pH 梯度。

3）如果使用等电点的蛋白标准，则染色后根据其电泳带的位置和等电点数据画出 pH 梯度曲线。

6.3.1.4　固定、染色、脱色

电泳结束后，弃去电极条，立即将凝胶放入固定液中固定 30 分钟。弃去固定液，用脱色液浸洗凝胶 5 分钟。弃去脱色液，将凝胶放入 60℃ 的染色液中 10 分钟。弃去染色液，用脱色液洗胶，并用湿棉花轻轻地擦凝胶的表面。多次更换脱色液，直到凝胶的背景完全脱去蓝色为止。溶液配方见表 6.5。这是快速考马

斯亮蓝 R-250 染色方法。根据样品性质和要求的不同，应采取不同的染色方法，4.2.4 节中介绍的各种方法，甚至 5.2.4 节中的部分方法均适用于等电聚焦电泳。但这些方法在等电聚焦电泳时，由于载体两性电解质的影响，脱色比较困难，而且灵敏度也不如常规聚丙烯酰胺凝胶电泳和 SDS 电泳，如银染法在 SDS 电泳时灵敏度可达 0.3ng，但在等电聚焦时只能检测 1～5ng[43]。

表 6.5　固定、染色、脱色、保存液的配置[38,39]

固定液：	将 34.5g 三氯醋酸和 10.4g 磺基水杨酸溶解在蒸馏水中。再加蒸馏水到 300ml。
脱色液：	混合 500ml 95％乙醇和 160ml 冰醋酸，加蒸馏水到 2L。用过的脱色液可通过一个活性炭柱除去染料，重新使用。
染色液*：	溶解 0.35g 考马斯亮蓝 R250 到 300ml 脱色液中，加 0.3g 硫酸铜边搅拌边加热至 60～70℃，配制后立即使用。
保存液：	用脱色液稀释 30ml 甘油到 300ml，搅拌备用。

* 在染色液中加少量硫酸铜，有利于背景脱色。

6.3.1.5　保存

脱色后的凝胶放在保存溶液中半小时，取出晾在玻璃板上，用一张脱色液浸湿的玻璃纸包裹凝胶板，或待凝胶发黏后，压一块透明塑料膜，晾干，这样一块带有染色蛋白带的凝胶板便可以永久保存了[38,39]。

6.3.2　琼脂糖凝胶等电聚焦

琼脂糖凝胶等电聚焦具有无毒性，电泳时间短，制胶、染色、脱色、保存容易的优点，并可以分离分析分子质量达百万的化合物，在大分子质量分子的分离分析中具有独特的地位。

6.3.2.1　制胶[38,39,42]

（1）模具的准备

用与聚丙烯酰胺凝胶毛细管灌胶法相同的模具可以灌注琼脂糖凝胶，但需使用与琼脂糖粘着好的支持膜。组装好的模具在 70℃烘箱中保温 15 分钟。

（2）琼脂糖溶液的配置[38,39,42]

将 0.15g 无电内渗琼脂糖加在盛有 14.1ml 蒸馏水的三角烧瓶中，在水浴上边搅拌，边加热煮沸。琼脂糖溶解后大约 10 分钟，停止加热，将水浴温度降到 75℃。加 0.9ml 欲要的 pH 范围的载体两性电解质到琼脂糖溶液中混匀。从烘箱中取出模具。用一个带橡皮管的注射器吸取溶液并灌注到两块玻璃板之间。灌注

时，将模具的一端抬高成一定角度，以便溶液流入，灌注后立即将模具放在水平位置（图6.14）。

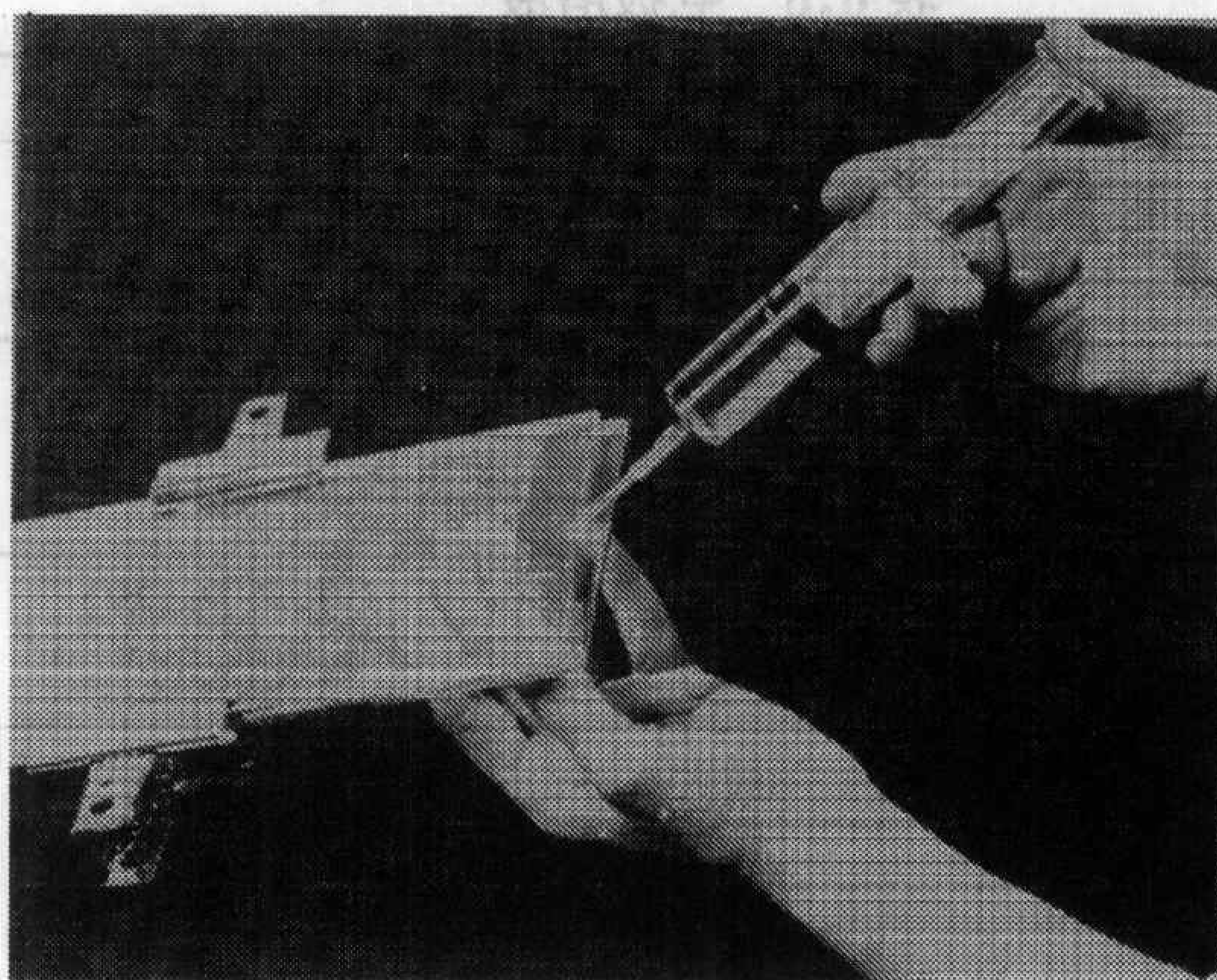


图6.14　琼脂糖凝胶的灌注[38,39]

（3）取胶

灌胶后在室温放置至少20分钟。用解剖刀切去两头多余的琼脂糖胶。然后一手抓住上面的玻璃板和支持膜，另一手拿住底层的玻璃板，掰开，见图6.15。琼脂糖凝胶固化后在冰箱中至少放1小时，使其充分凝固。在保持一定温度的情况下，可在4℃保存一周。使用前用滤纸轻轻地吸去凝胶表面的水。否则电泳时会短路烧胶。

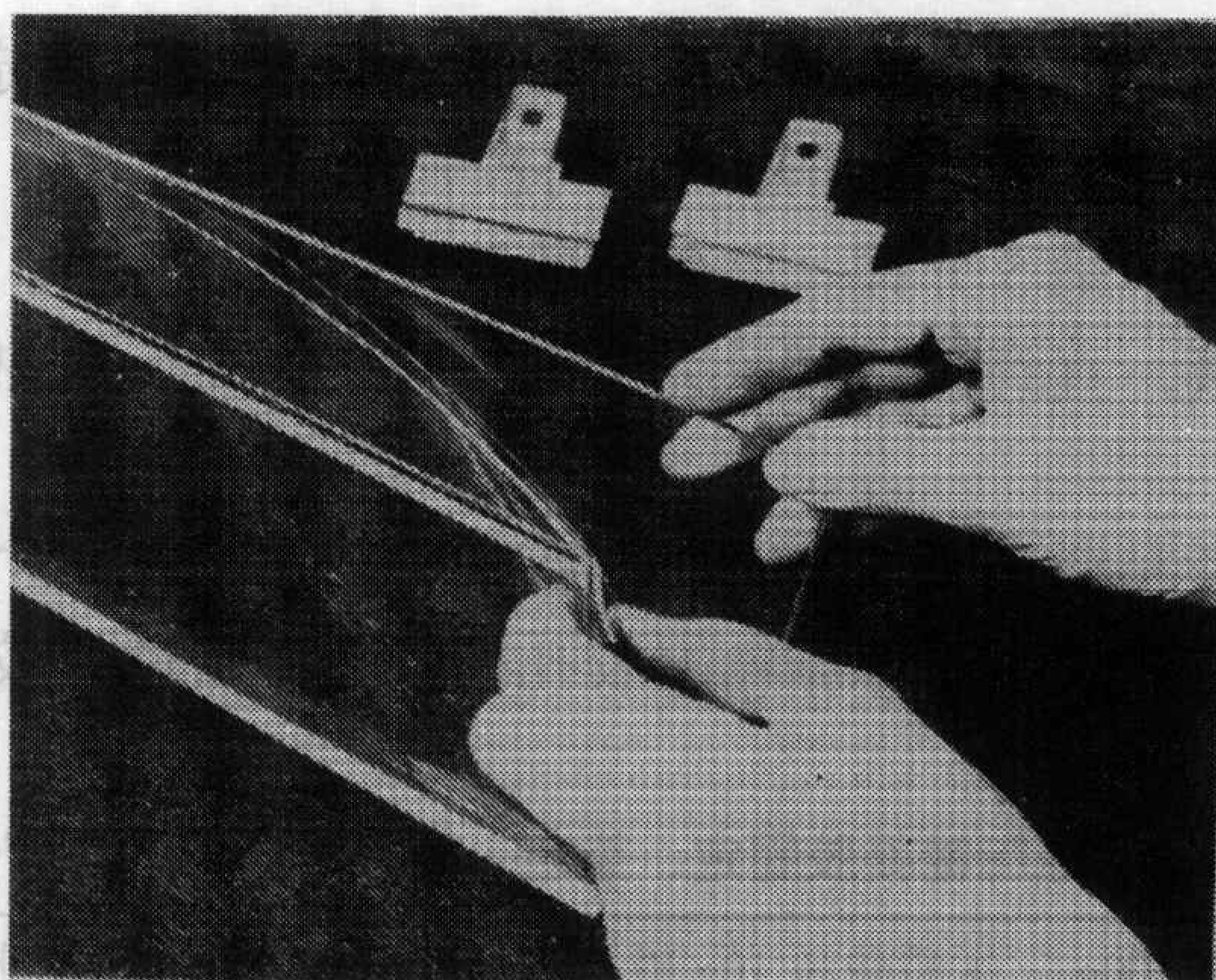


图6.15　取胶[38,39]

6.3.2.2　等电聚焦

用与聚丙烯酰胺凝胶相同的方法进行等电聚焦。电极溶液和电参数分别参见

表6.6和6.7。

表6.6 电极溶液[38, 39, 42]

pH范围	3.5～9.5	2.5～4.5	4.5～6.5	5.0～8.0
阳极	0.5mol/L醋酸	0.5mol/L醋酸	0.5mol/L醋酸	0.04mol/L L-谷氨酸
阴极	0.5mol/L氢氧化钠	0.4mol/L HEPES	0.5mol/L氢氧化钠	0.5mol/L氢氧化钠

表6.7 电参数[38, 39, 42]

pH范围	电压 E（V）设置在	电流 I（mA）设置在	功率 P（W）设置在	增加 P（W）使 E（V）降到下值以下
3.5～9.5	最大	最大	0	500
2.5～4.5	最大	最大	0	250
4.0～6.5	最大	最大	0	500
5.0～8.0	最大	最大	0	500

6.3.2.3 pH梯度的测定

pH梯度的测定同聚丙烯酰胺凝胶方法，但由于没有琼脂糖凝胶等电聚焦的蛋白标准，所以通常采用表面电极测定的方法。

6.3.2.4 固定、染色、脱色、保存

聚焦电泳结束后弃去电极条，立即将胶放入固定液中固定10分钟。弃去固定液，用95%乙醇洗10分钟。用热吹风将胶吹干。

将胶放在染色液中染5分钟。染色后的胶用脱色液脱色。用棉花轻轻地擦胶的表面并更换脱色液，直到胶的背景完全脱去蓝色为止。用热吹风吹干就可永久保存。

上述是常用的考马斯亮蓝R250琼脂糖凝胶染色方法，对不同的样品和要求可采用不同的染色方法。由于琼脂糖凝胶孔径较大，脱色比较容易，见表6.8。

表6.8 琼脂糖凝胶固定、染色、脱色液的配置[38, 39, 42]

固定液	将100g三氯醋酸和10g磺基水杨酸溶在500ml蒸馏水中，再用蒸馏水加到1000ml
染色液	溶解1.5g考马斯亮蓝R250于300ml脱色液中。在室温下搅拌一小时后过滤。溶液可使用多次，如有颗粒出现，重新过滤后可再使用
脱色液	350ml 95%乙醇，100ml冰醋酸，加蒸馏水到1000ml，使用后的脱色液通过一个活性炭柱除去染料后还可用

6.4 实验考虑

6.4.1 稳定介质的选择

所有的电泳都需要稳定作用来抗对流，所以在电泳中必须使用稳定介质（或称支持介质）。常用的稳定介质有滤纸、淀粉、凝胶等。在分析等电聚焦中目前大多使用聚丙烯酰胺凝胶和琼脂糖凝胶作为稳定介质，它们各有优缺点：

1）聚丙烯酰胺稳定能力高，化学稳定性好，是目前用于电泳最稳定的介质。

2）聚丙烯酰胺具有很好的亲水特性，并且透明性好，利于结果的图像分析。

3）用聚丙烯酰胺作稳定介质的等电聚焦的分辨率比用琼脂糖的高。

4）聚丙烯酰胺几乎没有带电的基团，电内渗小。琼脂糖常有带电的基团，必须经过特殊的纯化才能用于等电聚焦，否则电内渗将影响 pH 梯度及蛋白质的分离。

5）用聚丙烯酰胺作支持介质时，银染色效果比用琼脂糖好。

6）琼脂糖无毒，但丙烯酰胺和甲叉双丙烯酰胺是强神经性毒物。

7）用琼脂糖凝胶作支持介质所需要的制胶、电泳、固定、染色、脱色，保存的时间比用聚丙烯酰胺的短，且操作方便。

8）琼脂糖固化时不用催化剂，不会发生由于催化剂对蛋白分离的影响。

9）用聚丙烯酰胺凝胶只可分析分子质量小于 30 万的蛋白质[42]，但用琼脂糖凝胶可分析分子质量大至 2 百万的大分子[45]。

用于等电聚焦的合适的聚丙烯酰胺凝胶浓度约为 5%～8%，交联度约为 3%。琼脂糖浓度约为 1%。凝胶的机械性能，弹性是否合适对分离是很重要的。胶太软，难操作，且影响分辨率。太硬，则脆易断。凝胶的机械性能，弹性、透明度和黏着度取决于凝胶的总浓度 T 和交联度 C。

在聚丙烯酰胺和琼脂糖凝胶中添加甘油、蔗糖或山梨糖醇可以增加凝胶的机械稳定性和渗透能力，减少电泳时在凝胶表面的渗出水并可以增加凝胶与玻璃的黏着度[46]。这些添加剂的初浓度一般为 10%～12.5%[42]。

如 2.6 节所述，Righetti 等[47~51]对寻求新的电泳介质材料做了不少工作。

6.4.2 稳定介质的电内渗[2, 52]

使用固相凝胶介质的一个缺点是它们常引起溶剂或多或少的向阴极移动，这种影响叫电内渗。如 2.5 节所述，这是由于稳定相中有带电的基团造成的。电内渗随着所加的电压以及 pH 的增加而增加，但随着系统的离子强度和黏度而下降。当用聚丙烯酰胺，特别是用琼脂糖作为稳定介质时，聚焦后测得的 pH 梯度

常与载体两性电解质标明的 pH 范围有差别，这可能与电内渗有关，所以等电聚焦必须使用无电内渗的高纯度的稳定介质[44]。图 6.16 示出了不同纯度的丙烯酰胺对 pH 梯度的影响。由于稳定介质不纯而引起梯度向阴极漂移，在这里约为 1/3pH。作者还比较了 4 种不同公司生产的丙烯酰胺（Fluka 2x，Fluka 4x，BDH special for electrophoresis，Polyscience ultra）其丙烯酸的含量均在 0.1% 以下。但仍可见血红蛋白带聚焦后不同程度地向阴极漂移。10 分钟后约移 1.5mm，30 分钟后移 2.5mm。其中 Polyscience ultra 的漂移最小，10 分钟后 1mm，30 分钟后 1.8mm[2]。

琼脂糖的电内渗一般较高，需纯化后方可使用。作者曾使用上海东海制药厂生产的琼脂糖（电内渗小于 2%）作等电聚焦的支持介质，结果其 pH 梯度向阴极漂移 2 个 pH 以上。作者[44]又试用另一种国产琼脂糖（电内渗为 0.03 m_r）作支持介质，结果其 pH 梯度仍向阴极漂移 2 个 pH 以上，见图6.17。所以必须用无电内渗的琼脂糖才能作为等电聚焦的支持介质。

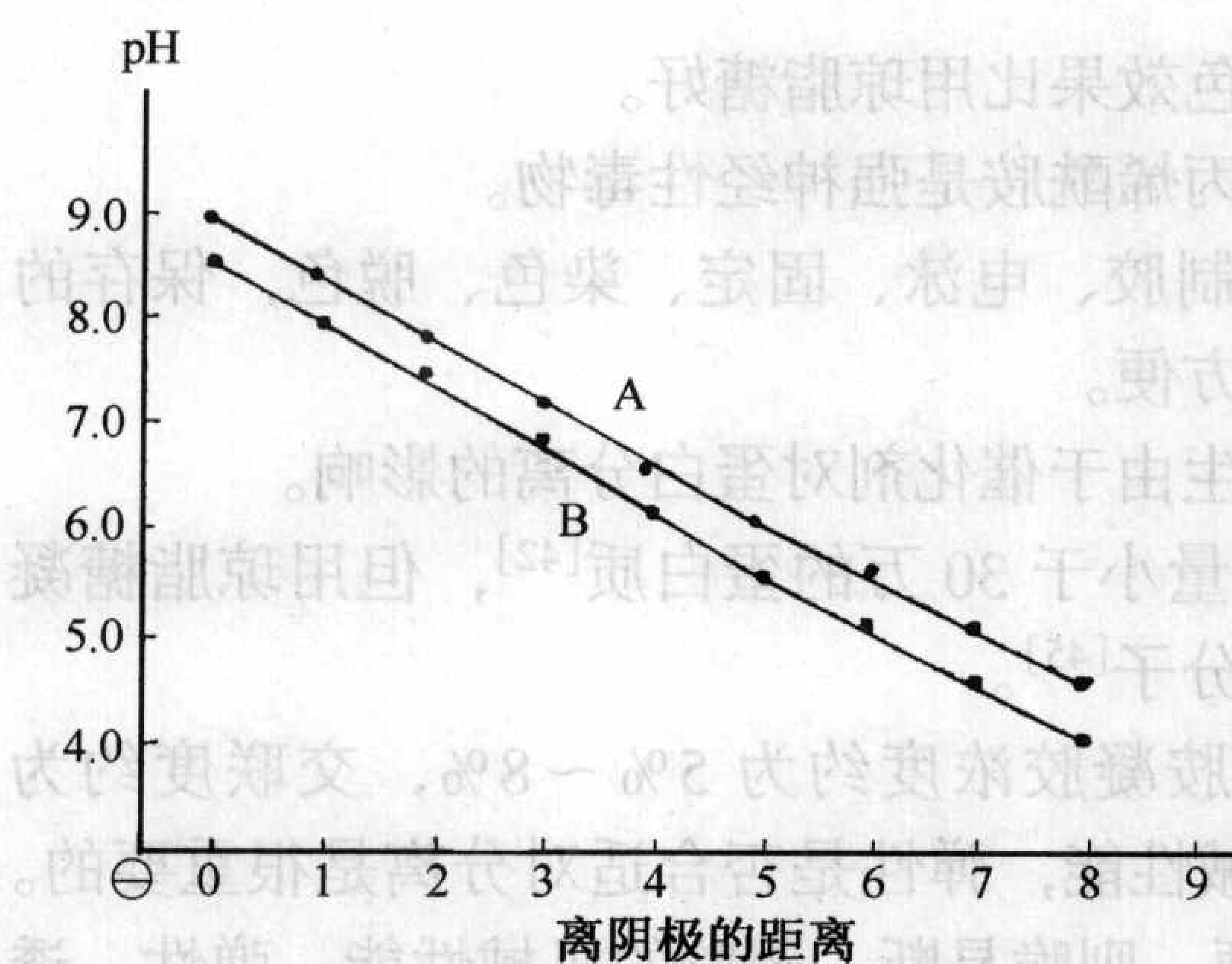


图 6.16 丙烯酰胺纯度对 pH 的影响
(pH3.5～9.5，10℃，20W，2 小时)[2]
A. 用重结晶的天津化学试剂一厂的丙烯酰胺得到的曲线；
B. 用商品的天津化学试剂一厂的丙烯酰胺得到的曲线

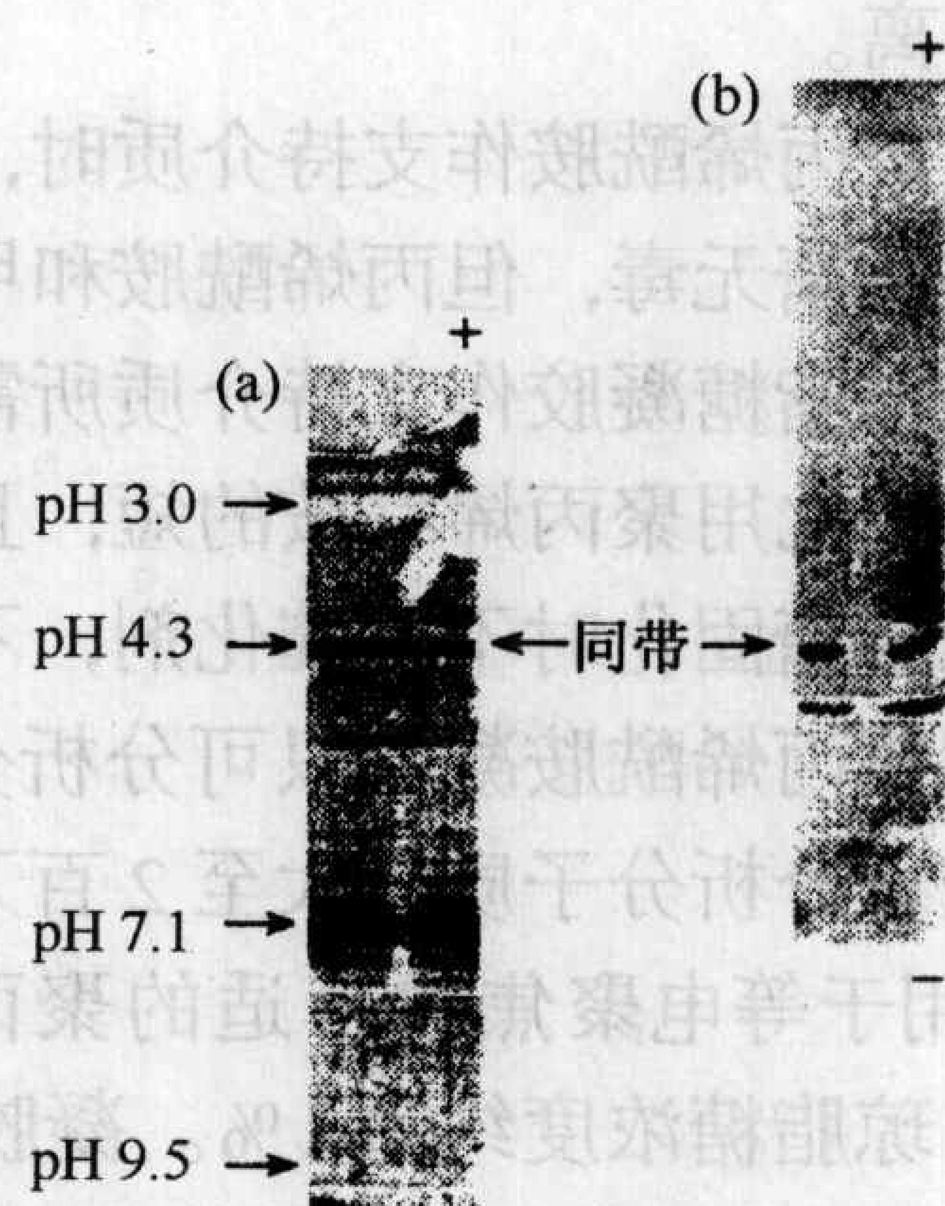


图 6.17 血红蛋白在电内渗为 (a) 0m_r和 (b) 0.03m_r 的琼脂糖凝胶等电聚焦中的阴极漂移现象[44]

电内渗的另一种原因是由大气中的二氧化碳引起的。这种现象首先由 Delincée 等[53]阐明。在 pH＞6.3 时，溶解在凝胶中的二氧化碳随 pH 而增加 (pH6.3 是碳酸的第一个介离 pK 值）并形成 HCO_3^-，而使 pH＞6.3 的梯度向阴极漂移。如果在系统中清除二氧化碳，蛋白带会明显变细窄。为此，系统最好在电泳时用惰性气体（如氩气，不能用氮气）冲洗。

6.4.3 载体两性电解质和 pH 梯度范围的选择

载体两性电解质是等电聚焦最关键的试剂，它直接关系到 pH 梯度的形成以及蛋白带的聚焦。常用的浓度为 2%～2.5%。2% 用于 2mm 厚胶，2.5% 用于 0.5mm 厚胶，3% 用于超薄胶。载体两性电解质的质量好，特别是导电性好，缓冲能力大，便可以加高在凝胶上的电压，从而缩短电泳时间，提高分辨率。但过高的电压，特别是使用低质量的载体两性电解质时，容易烧胶。

载体两性电解质应是略带一点淡黄色的水溶液。如果质量差，或保存时间太长，则溶液会变黄且发黏，此时便不能形成梯度。载体两性电解质的浓度一般为 40%，应在 4℃ 保存。使用时只需打开中心小面积铝盖，用注射器穿过橡皮盖抽取溶液，切勿用移液管，以便延长保存期。作者实验室使用过期十多年的 Ampholine，仍然可以得到满意的结果[54]。

pH 梯度的线性依赖于载体两性电解质的质量。凝胶的 pH 梯度范围是由所加的载体两性电解质的 pH 范围决定的。如欲制成 pH3.5～10 的凝胶就加 pH3.5～10 的载体两性电解质，依此类推。预混合的载体两性电解质有均匀的缓冲能力，均匀的导电性和线性 pH 梯度。但有时为了保证梯度的线性或对梯度的特殊要求，需要混合两种或两种以上 pH 范围的载体两性电解质。在有兴趣的范围使其重叠，从而提高这一 pH 范围的分辨率和加样量[46]。

pH 梯度范围的选择决定于被分析的蛋白质的等电点。对于一个未知样品，

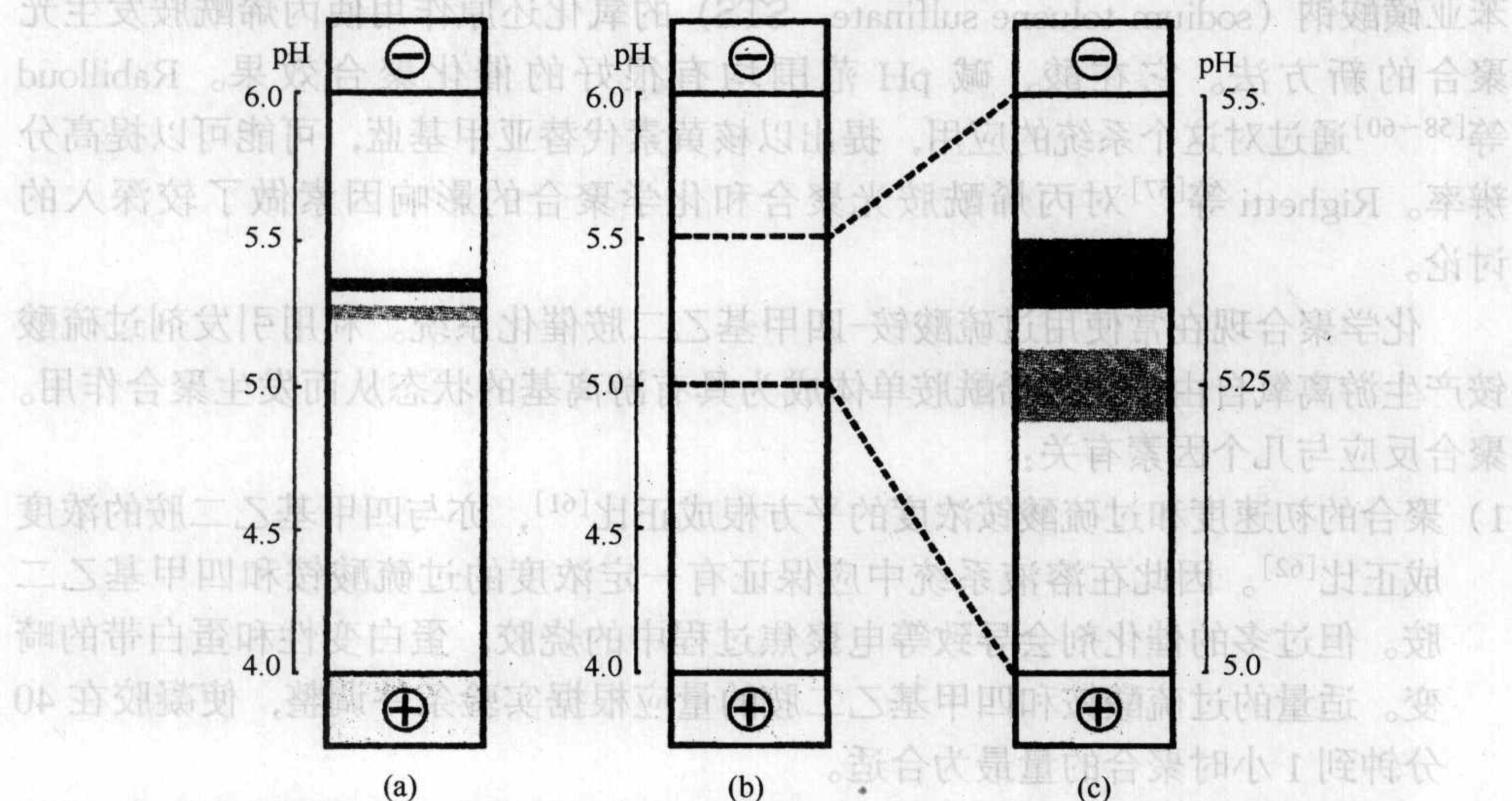


图 6.18 等电聚焦的放大技术

(a) pH4～6，低分辨率；(b) pH4～6，没有加样；(c) pH5.0～5.5 高分辨率

通常先用宽的 pH 范围来找出欲测蛋白质的 pI 位置，然后再用合适的窄 pH 范围以更好地分辨这些谱带并精确地测定其等电点，见图 6.18。使用窄 pH 范围不但可以提高分辨率，还可以增加样品负载容量，更有利于制备。

pH 梯度范围的稳定性，决定于载体两性电解质的质量，电泳时的电参数，也与凝胶系统的组成有关，如在凝胶中增加甘油，蔗糖或山梨糖醇（10%～15%），可以增加黏度，减少电内渗，提高 pH 梯度的稳定性。

6.4.4 丙烯酰胺的聚合

丙烯酰胺的聚合是等电聚焦成功的第一个关键步骤。一般来说，由于 pH 的影响，加有载体两性电解质的凝胶的聚合比加有 SDS 和碱性缓冲液的凝胶的聚合要困难一些。目前丙烯酰胺凝胶的聚合有两种方式：光聚合和化学聚合，后者比较常用。

光聚合是个光激发的催化反应。常用核黄素-四甲基乙二胺催化系统。作为引发剂用的核黄素在光照下分解，黄素被还原成无色型；但在有氧条件下无色型又被氧化成有游离基的黄素环使丙烯酰胺聚合作用开始。光聚合的优点是用量少，不会对分析的样品有任何不良影响。且聚合作用所需时间可以较自由的控制，但核黄素的光照量不易掌握[2,38]。

1993 年 Lyubimova 等[55,56]和 Righetti 等[57]提出用亚甲基蓝（methylene blue，MB）为引发剂，利用二苯氯化碘（diphe yliodonium chloride，DPIC）和甲苯亚磺酸钠（sodium toluene sulfinate，STS）的氧化还原作用使丙烯酰胺发生光聚合的新方法。它在酸、碱 pH 范围均有很好的催化聚合效果。Rabilloud 等[58~60]通过对这个系统的应用，提出以核黄素代替亚甲基蓝，可能可以提高分辨率。Righetti 等[57]对丙烯酰胺光聚合和化学聚合的影响因素做了较深入的讨论。

化学聚合现在常使用过硫酸铵-四甲基乙二胺催化系统。利用引发剂过硫酸铵产生游离氧自由基使丙烯酰胺单体成为具有游离基的状态从而发生聚合作用。聚合反应与几个因素有关：

1）聚合的初速度和过硫酸铵浓度的平方根成正比[61]，亦与四甲基乙二胺的浓度成正比[62]。因此在溶液系统中应保证有一定浓度的过硫酸铵和四甲基乙二胺。但过多的催化剂会导致等电聚焦过程中的烧胶，蛋白变性和蛋白带的畸变。适量的过硫酸铵和四甲基乙二胺的量应根据实验条件调整，使凝胶在 40 分钟到 1 小时聚合的量最为合适。

过期的过硫酸铵和四甲基乙二胺不但不能引发与加速丙烯酰胺的聚合，而且会给烧胶和带的畸变增加潜在危险，所以应使用新鲜试剂和新鲜配制的溶液。

2）引发作用需要在碱性条件下进行。因此对在酸性 pH 范围中的丙烯酰胺的聚

合不能使用过硫酸铵-四甲基乙二胺催化系统。碱性范围的凝胶虽然容易聚合，但其胶比较脆，且在电泳后的固定、染色、脱色等过程中胶与膜的黏着情况不佳，容易龟裂[63]。

3）温度过低，催化反应不能进行，所以灌胶后应立即将凝胶放在30～40℃烘箱中，促使凝胶聚合。

4）溶解氧的存在会影响催化反应的进行，因此最好用新鲜蒸馏水配置溶液，并在加过硫酸铵以前一定要抽气。加过硫酸铵和四甲基乙二胺时，要轻轻混合溶液，避免气体再次陷入。

5）不纯物的存在也会影响凝胶的聚合和 pH 梯度的稳定性，所以一定要选用高质量的丙烯酰胺和甲叉双丙烯酰胺。变质和低质的单体溶解困难，使聚丙烯酰胺的浓度不能得到保证。

酸性范围的凝胶聚合和电泳是比较困难的。过硫酸铵-四甲基乙二胺和核黄素-四甲基乙二胺系统均不能在酸性 pH 范围使丙烯酰胺发生化学聚合或光聚合，因为四甲基乙二胺在低 pH 范围被质子化[64]。Jordan 等[65]采用硫酸铁-抗坏血酸-过氧化氢系统使丙烯酰胺在酸性 pH 范围聚合。作者[39]试验了用过硫酸铵作引发剂，用四甲基二乙胺、硝酸银、硫酸铁或硝酸钾作增速剂来促使凝胶聚合，结果提示只有硝酸银能作为良好的增速剂，配方如表 6.9。

表 6.9　酸性 pH 范围凝胶贮液的配制[39]

凝胶浓度与交联度	$T=5\%$ $C=3\%$	$T=7.5\%$ $C=3\%$
单体贮液（ml）	2.5	3.75
40%载体两性电解质（ml）	0.9	0.9
双蒸水（ml）	11.4	10.15
将上述溶液置子抽滤瓶中抽气 5～10 分钟		
10%过硫酸铵（μl）	75	75
0.6%硝酸银（μl）	100	100

注：①凝胶溶液应先抽气，过硫酸铵应在即将灌胶前加。
②溶液体积视凝胶大小按比例增减。
③过硫酸铵和硝酸银的量视聚合情况增减。
④$T=5\%$，$C=3\%$的凝胶适合于分析分子质量小于 3MDa 的样品。$T=7.5\%$，$C=3\%$的凝胶适合于分析分子质量小于 1MDa 的样品。

上述的亚甲基蓝-二苯氯化碘-甲苯亚磺酸系统[55~57]或核黄素-二苯氯化碘-甲苯亚磺酸系统[58~60]是近年来用于酸性 pH 范围比较成功的催化系统。

6.4.5　电极溶液

阳、阴极电极溶液的作用是为了避免样品或载体两性电解质在阳极氧化或在

阴极还原。电极液通常由不挥发的酸或碱配制。阳、阴电极液的 pH 应比阳、阴极端的 pH 略低和高。通常强酸或强碱液被作为宽 pH 范围的电极液，窄 pH 范围则用弱酸或弱碱。

电极液的选择会影响最终的 pH 梯度，特别是在靠近电极条的位置。选择合适的阳极液有时能改善梯度的“阴极漂移”[66]。增加电极液的浓度则能提高 pH 梯度的稳定性[66]。但使用过量的电极液会使靠近电极条的 pH 梯度产生波浪状，影响蛋白的分离。为了得到重复的结果，每次实验应使用相同浓度和相同体积的电极液。

6.4.6 四甲基乙二胺（TEMED）对丙烯酰胺凝胶的聚合和 pH 梯度的影响（扩展 pH 梯度碱性侧）

TEMED 是一种第三芳香胺，它可以作为化学聚合和光聚合的加速剂早就为人们所熟知。这是一种温和的还原剂（氢给体），可以通过与氢受体反应而和单体复合从而促使聚合。早在 1973 年 Karlsson 等[67]认为在含有载体两性电解质的丙烯酰胺凝胶中不需要加 TEMED，因为载体两性电解质本身含有足够的第三氨基可作为加速剂促使聚合，尽管效果不如 TEMED 好。作者的实验提示[62] TEMED 可以加速在 pH3.5～10 以及中性，碱性 pH 范围的丙烯酰胺的聚合，但在酸性 pH 范围（pH<5）则无加速作用。

TEMED 还能扩展聚丙烯酰胺凝胶 pH 梯度碱性侧的 pH[62]。在阴极端 pH 端的扩展与 TEMED 的量有关。在 20ml 的凝胶溶液中，50μl 的 TEMED 能在离阴

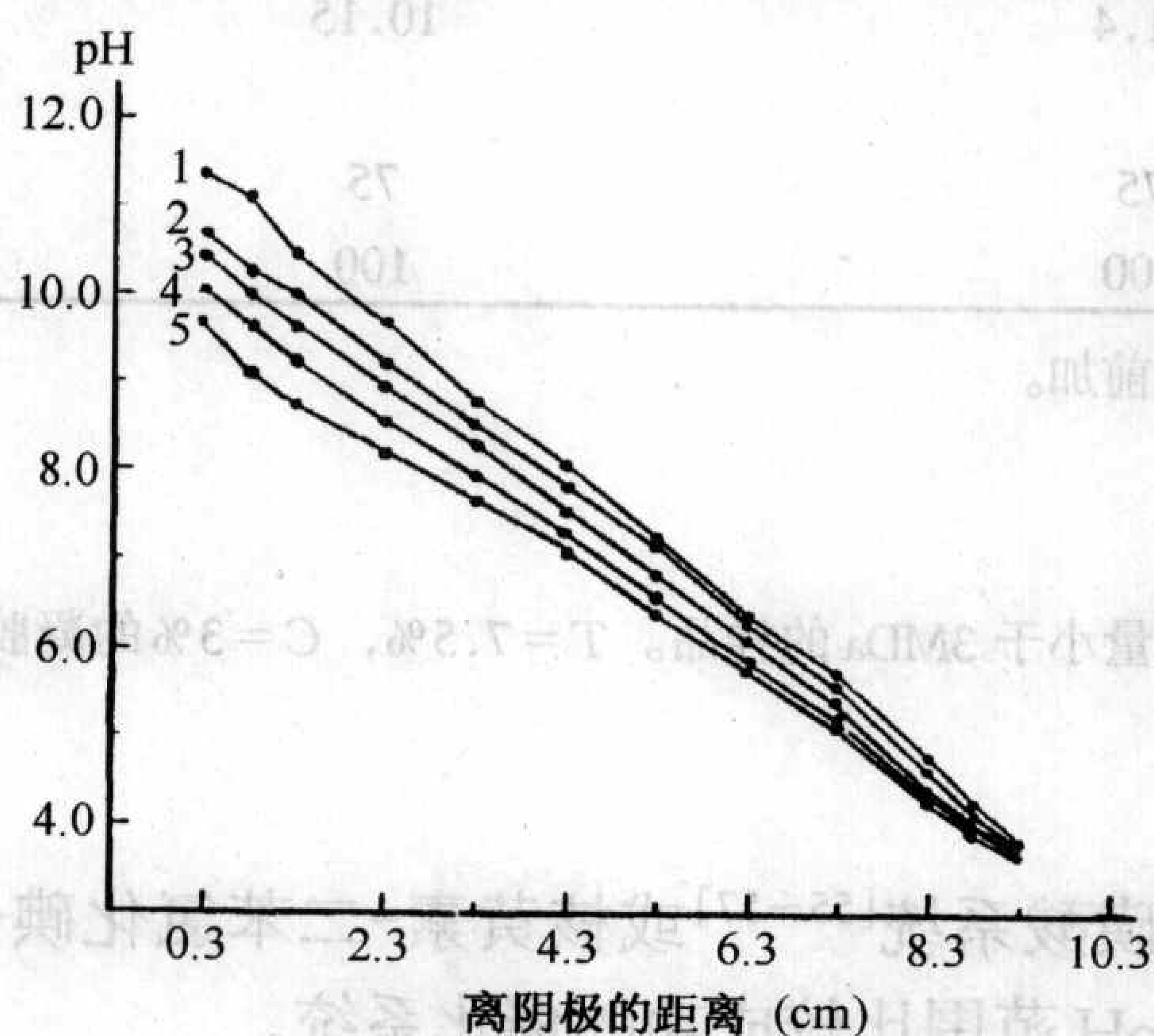


图 6.19 TEMED 对 pH3.5～9.5 梯度的扩展作用[62]

20ml 凝胶溶液中 TEMED 的量：(1) 100μl；(2) 75μl；(3) 50μl；(4) 25μl；(5) 0μl

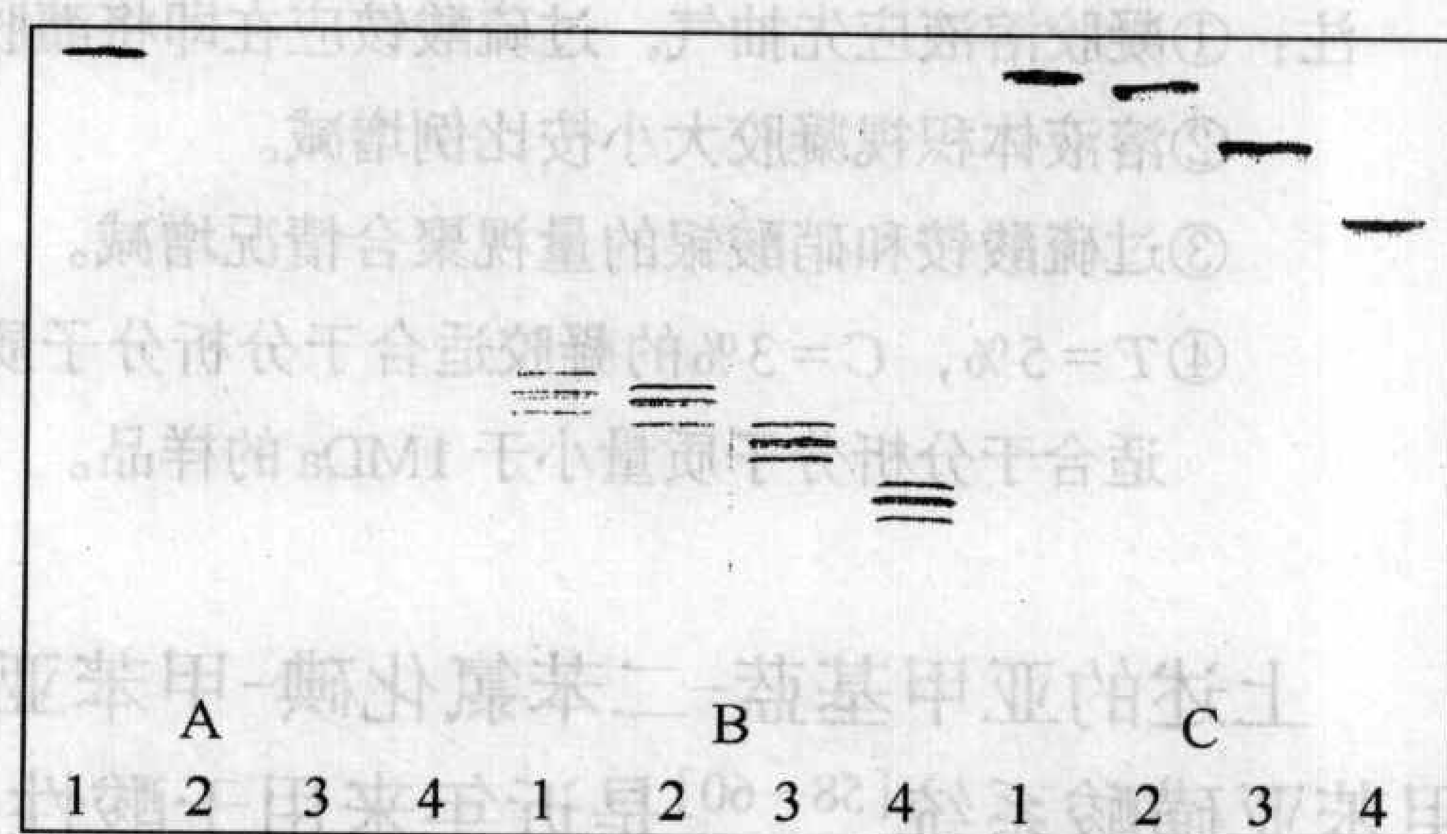


图 6.20 在 20ml 凝胶溶液中加 (1) 0μl；(2) 25μl；(3) 50μl；(4) 100μl TEMED 对 (A) 细胞色素 c；(B) 血红蛋白；(C) 胰蛋白酶原聚焦带位置的影响[62]

极 0.3mm 的地方扩展0.7pH。100μl 的 TEMED 能扩展 1.3pH。这样使得用 pH3.5～9.5的载体两性电解质能得到 pH 3.5～11 甚至更宽的梯度，如图 6.19 所示。一些碱性蛋白质，例如细胞色素、溶菌酶、组蛋白就能用高分辨的等电聚焦来研究。图 6.20 示出细胞色素 c，血红蛋白和胰蛋白酶原在具有 TEMED 扩展作用的 pH3.5～9.5Ampholine 凝胶中蛋白带的位置，可见 TEMED 扩展 pH 梯度的作用对碱性蛋白的分析是很有意义的。这个研究的实用价值还在于由于大气中二氧化碳的影响，在等电聚焦时，pH 梯度的碱性侧常常不能达到载体两性电解质应有的碱性 pH，这是由于二氧化碳在凝胶的碱性侧电解成碳酸之故。为了分析碱性蛋白常常需要使用通氩气（或其他比空气重的气体）的密封电泳槽，这当然不是经济的方法。相比之下，用添加不同量的 TEMED 方法既节省又方便。

6.4.7 样品的预处理

样品的预处理是等电聚焦过程中又一关键步骤，最重要的一点是最好将样品溶解在双蒸水中。因为盐离子，哪怕只是很低的浓度，也会破坏 pH 梯度，使结果成波浪形，并且这些离子还会产生高电流而导致烧胶。图 6.21 说明 L-氨基酸氧化酶溶解在 NaCl、Tris 或磷酸缓冲液时，盐离子对聚焦带的影响。图中可见 Tris 缓冲液的影响较小，NaCl 和磷酸缓冲液的影响较大。故欲等电聚焦的样品必须避免使用高盐浓度的缓冲液，因为盐离子干扰 pH 梯度的形成并使蛋白带畸变。在水中和低盐浓度缓冲液中难溶的样品可加入 1% 甘氨酸，它是两性离子，

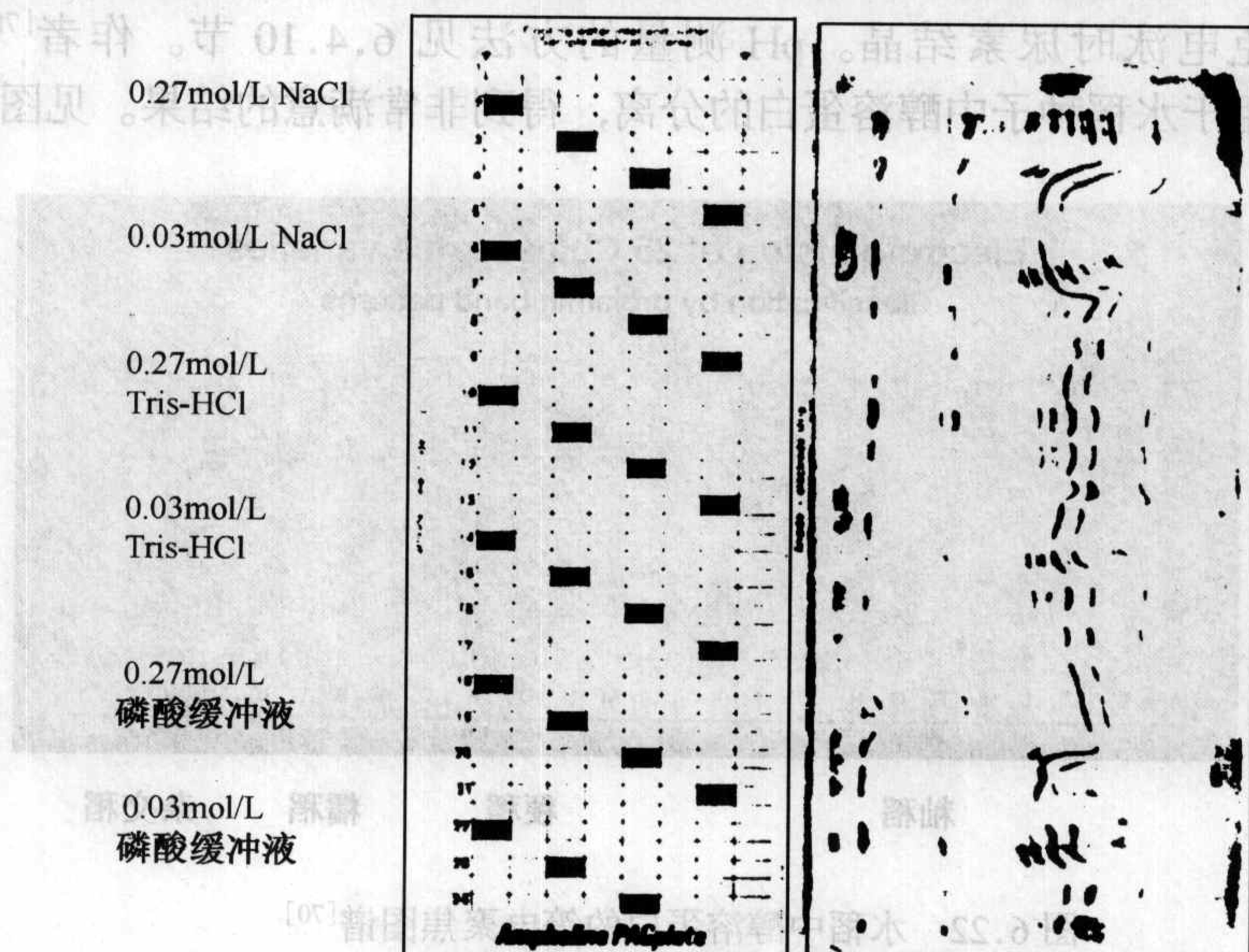


图 6.21 盐离子对等电聚焦的影响

由于溶剂的偶极矩作用可以增加蛋白质的可溶性，但不影响 pH 梯度。2%的载体两性电解质也有增加样品溶解度的作用。此外，还有一些解聚试剂，如 50%二甲亚砜，50%二甲基甲酰胺，90%甲酰胺，33%乙烯甘油或四甲基尿素也可使用。

为了提高疏水蛋白在水中的可溶性，常用的添加物是尿素，非离子去污剂或两性离子去污剂。添加物的作用是：增加蛋白的溶解度；解聚蛋白复合物、亚基或从蛋白上去掉脂；避免蛋白氧化，断裂二硫键；增加黏度以稳定 pH 梯度和使谱带细窄，提高分辨率；稳定蛋白或者通过添加物与蛋白形成复合物而改变等电点。

(1) 尿素

尿素可以改善疏水蛋白和 pH 接近 pI 时蛋白的可溶性，也常用于增加多肽的溶解度。尿素的溶解效应是由于它破坏疏水键和离子键，而使蛋白质部分的去折叠。有时尿素和 Triton X-100或别的非离子去污剂一起使用更能改善结果。尿素的浓度取决于对溶解的要求和蛋白变性的影响，可使用的浓度范围在 2～9mol/L[68]，但一般用 4～8mol/L。使用含有尿素的样品时，在凝胶中也要加相应浓度的尿素。含有尿素的样品和凝胶只能当天使用，特别在高温和高 pH 的水溶液中，尿素会水解成氨和氰酸盐，氰酸盐则会引起蛋白质的氨基甲酰化，并由此改变蛋白质的等电点。所以必须使用高质量的尿素和新鲜配制的溶液。样品最好加在预聚焦凝胶的阳极侧，因为在 pH＜5 时，不会产生氰酸盐，也不会使氨基甲酰化[69]。使用高浓度尿素 8mol/L 凝胶进行电泳时，冷却板的温度须高于 15℃，以避免电泳时尿素结晶。pH 测量的方法见 6.4.10 节。作者[70]曾将 8mol/L尿素用于水稻种子中醇溶蛋白的分离，得到非常满意的结果。见图 6.22。

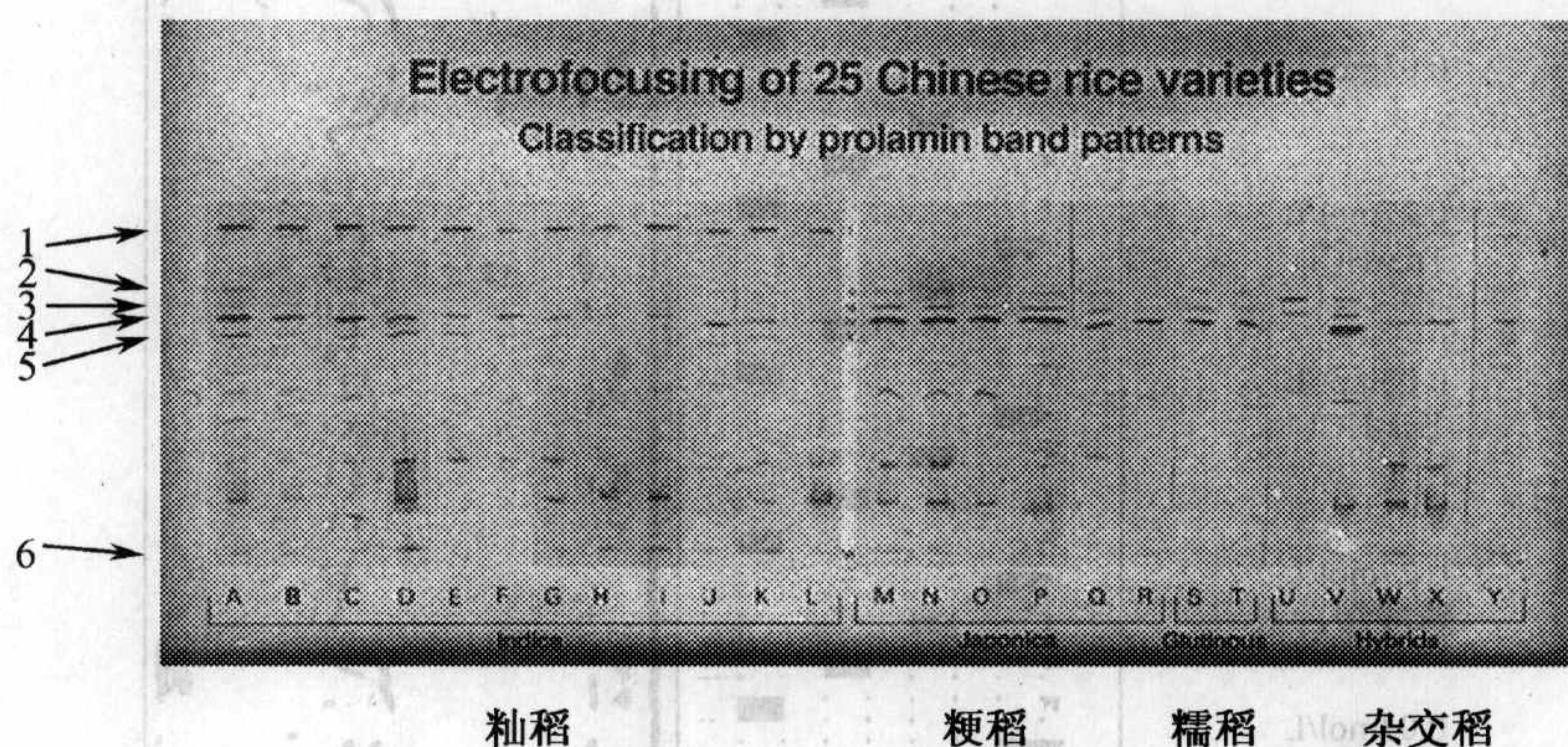


图 6.22　水稻中醇溶蛋白的等电聚焦图谱[70]

1 (pI 9.3)，2 (pI 8.2)，3 (pI 8.0)，4 (pI 7.7)，5 (pI 7.4)，6 (pI 5.3)

尿素能增加聚丙烯酰胺凝胶的机械强度，并增加与玻璃的黏着度，但减弱与凝胶支持膜的黏着度。在琼脂糖凝胶中不适合添加高浓度的尿素，因为尿素会破坏多糖链的螺旋结构构型。在这种情况下，最好使用能再水合的琼脂糖凝胶[71]。

(2) 非离子去污剂和两性离子去污剂

大部分蛋白质在使用非离子去污剂和不带电的两性离子去污剂时，能在不破坏蛋白质结构，保持生物活性的情况下改善蛋白的溶解度，但必须选择合适的浓度，过低的浓度不能改善蛋白质的可溶性。过高的浓度会使蛋白带变宽，影响分辨率和引起纹理现象。尿素和去污剂结合使用是解决疏水蛋白，如膜蛋白的可溶性的最好方法。

Triton X-100（polyoxyethylene-p-t-octylphenol）和NP-40（Nonidet P-40）是等电聚焦中最常用的去污剂，通常只在聚丙烯酰胺凝胶中使用。在凝胶中的浓度为0.05%到0.5%，在样品中的浓度可以高达2%。高浓度的Triton会引起电泳过程中的纹理现象，并影响染色。

Tween 20（polyoxyethylene (20) sorbitan monolaurate）、Tween 40和Tween 80是温和型去污剂，它们可以在保持蛋白质活性的情况下，提高溶解度。

Chaps {3-[(3-cholamidopropyl) dimethylammonio]-1-propanesulfonate} 是一种两性离子去污剂，可以破坏非专一性蛋白相互作用，并保持蛋白质的天然结构。

(3) 还原试剂

还原试剂将断开蛋白质的二硫键，低浓度（1mmol/L）的还原试剂可以阻断蛋白的氧化和保持许多酶的生物活性。常用的还原试剂，如β-巯基乙醇，二硫苏糖醇和二硫赤藓糖醇（dithioerythritol，DTE）等。

如果样品中有盐，可以通过透析法除盐，但是用透析袋透析常常会降低溶液浓度，使低浓度蛋白测定困难。为此可将样品放在带有透析膜管盖的小管中，再将小管倒置在透析液中，搅拌透析，这样不但可以缩短透析时间，而且较易控制溶液浓度，如使用GE医疗集团，安玛西亚公司的微量透析附件。如果在透析过程中沉淀，可在透析液中加1%甘氨酸或两性离子去污剂，因为它们不会干扰pH梯度。

样品除盐也可用凝胶过滤（Sephadex G-25的PD-10柱或NAP™-10柱）脱盐或用HiTrap脱盐柱脱盐。

6.4.8 加样方法

根据等电聚焦的原理，每个蛋白质都被浓缩在它的pI位置，所以样品不需要像SDS电泳和常规电泳一样加成窄带，而且可以加在凝胶表面的任何一个位置都可得到相同的结果。但在实际上对于某些样品还应考虑加样位置，以得到更

好的结果。

初次实验时，可用不同浓度的样品，且放在不同位置来摸索，以确定合适的浓度和位置。对不稳定的样品可先将凝胶预聚焦，再将样品放在靠近等电点的位置以缩短样品电泳的时间，但不要将样品加在其等电点位置和紧靠阳、阴极的地方。如加在等电点位置，样品不易从滤纸块渗漏到凝胶中，不利于分辨率的提高。如加在紧靠阳、阴极的地方，会引起蛋白的变性。聚焦一定时间后，去掉加样滤纸，可以避免拖尾现象。

加样量决定于样品中蛋白质的种类，数量，pH 梯度的范围，凝胶的厚度以及检测方法的灵敏度。窄 pH 梯度范围的样品量应多于宽 pH 范围。凝胶厚度大的加样量应多于薄层凝胶。如用考马斯亮蓝 R-250 染色时，对 0.5mm 厚的凝胶，样品浓度以 0.5～2μg/μL 为宜，最适加样体积为 5～20μl（5mm×10mm 加样块）。如果样品较浓，可直接在凝胶上滴加 1～3μl 样品。如果样品较稀，可用一个塑料小框盛液或用一小块泡沫塑料吸取样品。通常可将样品加在加样滤纸上，可减少拖尾现象。如用银染色法检测，可将加样量减少。

6.4.9 电参数（电压、电流、功率、温度和时间）

在等电聚焦电泳中，通常采用恒功率方式。功率是电压和电流的乘积，见图 6.23。在等电聚焦过程中，随着样品的迁移，电流会越来越小，为了使样品中的组分更好更快地分离应不断地加高电压。根据分辨率的计算公式，凝胶上所加的功率（电压）越高越好，因为分辨率随着场强的增加而增加。高电压可以减少形成 pH 梯度和蛋白质分离所需要的时间，但过高的电压可能会使样品变性和影响 pH 梯度的稳定性，甚至烧胶。凝胶上可加的功率（电压）取决于多种因素，如聚丙烯酰胺介质和样品的质量，过硫酸铵和 TEMED 的用量，胶层的厚薄，载体两性电解质的导电性和 pH 范围，电泳系统的温度控制等，特别是后两个因素比较重要。

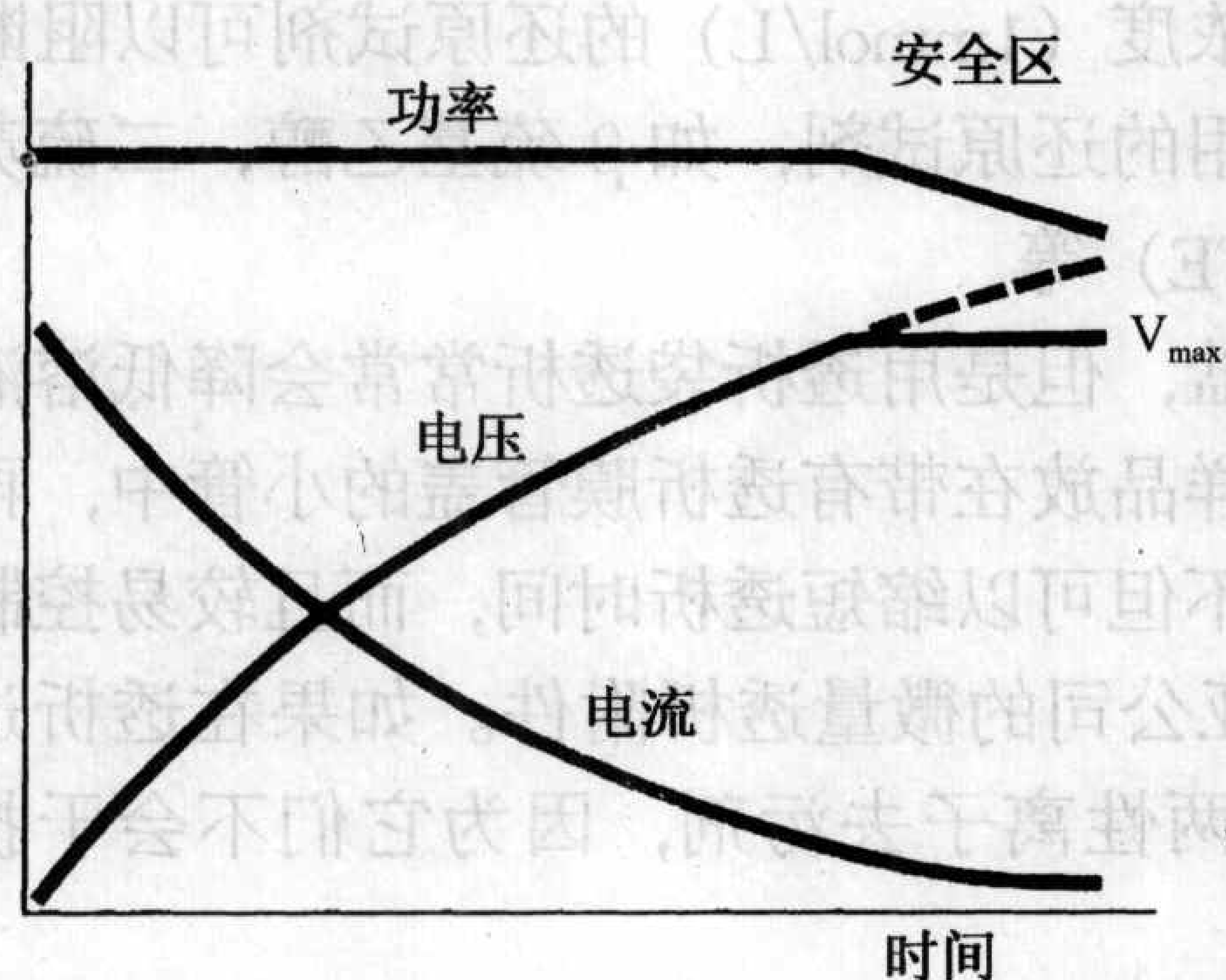


图 6.23　等电聚焦的恒功率方式

为了得到尽可能高的分辨率和使用尽可能短的电泳时间，应采用较高的电压。但如前所述在凝胶上可加的高压与系统的冷却能力有关。冷却不好，在等电聚焦过程中产生的热会把胶烧坏。这也就是为什么胶层越薄，分辨率越高，电泳时间越短的原因。合宜的冷却水温度为 4～10℃。应避免使用过低的温度，特别是夏天，因为在有很高温度的夏天使用过冷的冷却系统会使凝胶周围形成冷凝水

而导致烧胶。

等电聚焦的时间决定于凝胶的 pH 范围，样品的迁移率和电泳时的电参数。一般在窄 pH 范围所需的电泳时间比宽 pH 范围长。这是因为在窄 pH 范围蛋白质已接近它的等电点，带电少，故迁移慢。

合适的等电聚焦的时间选择是很重要的，过早的结束等电聚焦会影响组分的分离效果，但延长聚焦时间会损失生物活性和发生 pH 梯度的变化，同样会影响分离效果，所以对未知样品应进行不同时间的试验性电泳，大致可有如下三种方法：

1）将有颜色的蛋白样品（如血红蛋白）和未知样品加在凝胶的不同位置。待有色蛋白的聚焦带走在同一位置时，视为聚焦结束。见图 6.24。这个方法虽然操作简单，但由于不同的样品需要不同的聚焦时间，所以该方法并不理想。

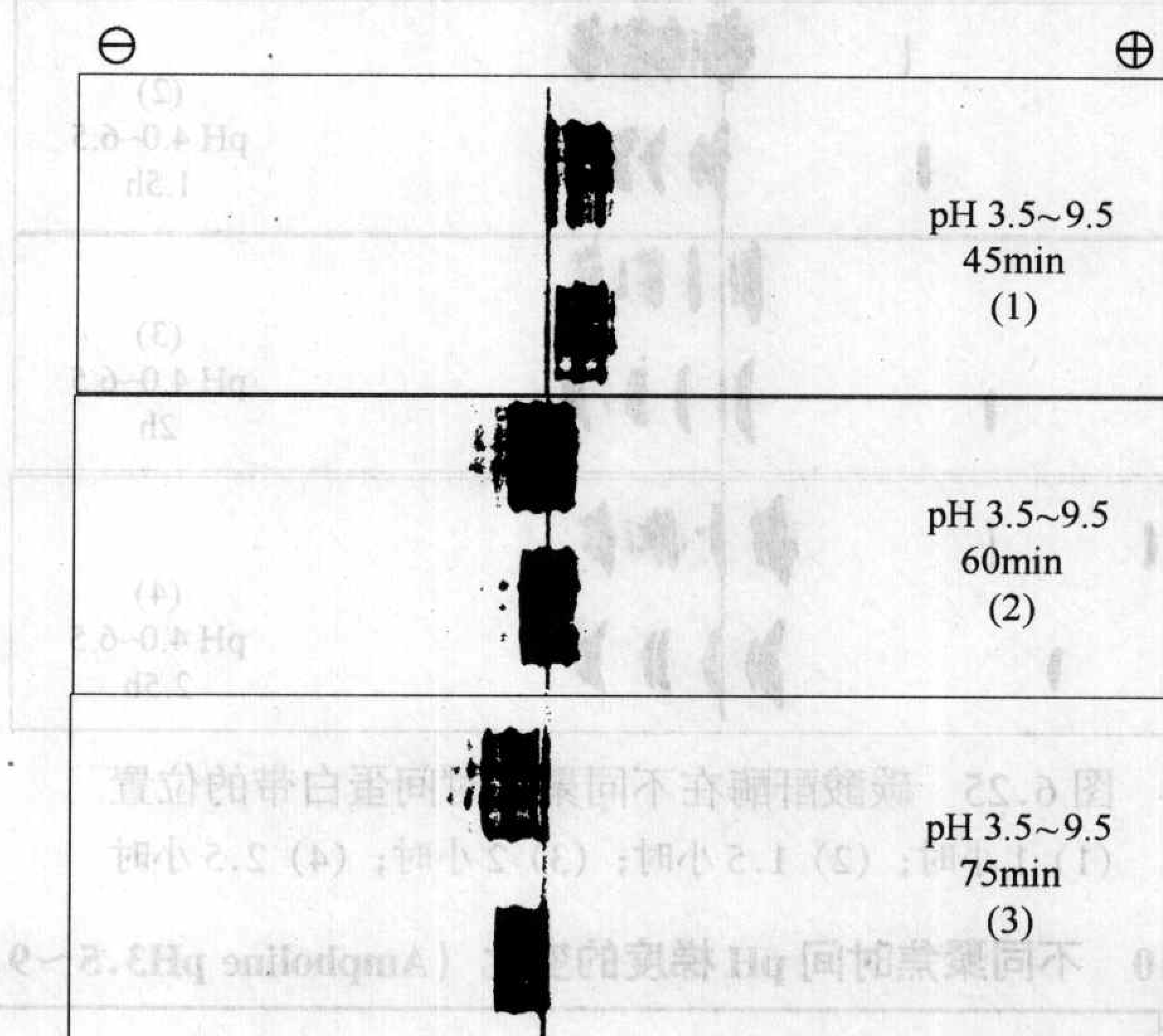


图 6.24　血红蛋白在不同聚焦时间的蛋白带位置

（1）45 分钟；（2）60 分钟；（3）75 分钟

2）根据等电聚焦的原理，样品在等电聚焦过程中不断地失去电荷，电流会越来越小。当样品到达等电点位置时，电流应为零，此时应认为等电聚焦完成，但实际上由于电泳系统中的复杂情况，电流不可能减小到零。如果凝胶的电流已达到最小值，不再下降，便可认为聚焦已完成。

3）比较可靠的方法是进行不同时间的试验性电泳。将在阴、阳两极侧分别加有相同的样品的凝胶电泳一段时间后，剪下一小块进行染色，余下的继续电泳。在不同的间隔时间再切下一小块，染色。观察这些结果就可得到最佳分辨率的合适电泳时间。作者曾对多种蛋白进行过这种时间实验。血红蛋白在

分离距离约为 10cm 的凝胶上，最佳时间约为 60 分钟如图 6.24。但如图 6.25 所示，碳酸酐酶的最佳分离时间约为 1.5～2 小时。因为在 1 小时时，加在阴、阳两极侧的样品未走到同一位置。在 1.5 小时时才走到同一位置，双带开始分辨。在 2 小时时，双带分辨清楚。在 2.5 小时时，虽然聚焦带清晰，但有 pH 梯度向阴极漂移的现象。表 6.10 和6.11也都说明了这一点。同时作者从大量实验还观察到，可能是由于强碱性的电极液所致，靠近阴极约 2cm 处的 pH 大大高于载体两性电解质碱性侧的 pH。

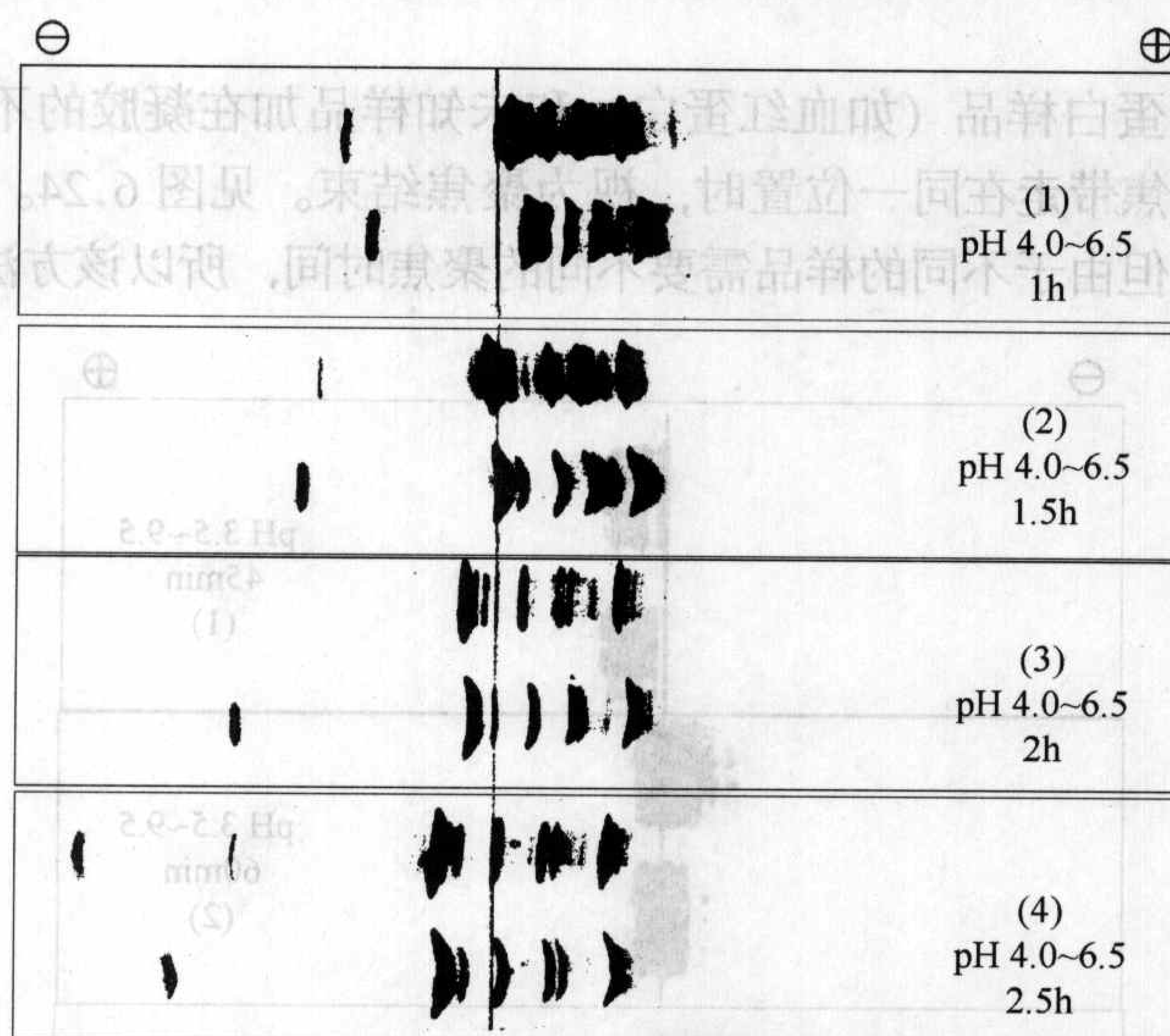


图 6.25　碳酸酐酶在不同聚焦时间蛋白带的位置

(1) 1 小时；(2) 1.5 小时；(3) 2 小时；(4) 2.5 小时

表 6.10　不同聚焦时间 pH 梯度的变化（Ampholine pH3.5～9.5）

时间 \ 离阴极的距离 (cm)	1	2	3	4	5	6	7	8	9
45 分钟	10.02	9.36	8.62	7.93	7.23	6.48	5.48	4.47	3.59
60 分钟	10.04	9.25	8.57	7.83	7.09	6.41	5.55	4.40	3.68
75 分钟	10.00	9.17	8.51	7.82	7.07	6.47	5.72	4.58	3.73

表 6.11　不同聚焦时间 pH 梯度的变化（Ampholine pH4.0～6.5）

时间 \ 离阴极的距离 (cm)	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1 小时	8.01	7.08	6.71	6.32	5.92	5.70	5.33	4.82	4.35
1.5 小时	7.45	7.08	6.34	6.06	5.70	5.45	5.19	4.75	4.28
2 小时	7.35	7.08	6.32	5.94	5.69	5.41	5.17	4.71	4.25
2.5 小时	7.20	6.59	6.30	5.91	5.63	5.40	5.09	4.72	4.26

6.4.10 pH梯度和pI的测定

早期测定pH梯度的方法，特别是使用圆盘电泳时，是将凝胶切成一段段浸泡在蒸馏水中（或在10mmol/L氯化钾中）浸泡后测定浸泡液的pH。但此法繁琐，且不准确，特别是不能被用于测定pH7以上的pH梯度，因为浸泡液将吸收大气中的二氧化碳而干扰pH测定。

平板电泳特别是水平平板电泳可以用表面电极或等电点蛋白标准来测定pH梯度。但前者需要有昂贵的表面电极和pH计，且操作比较麻烦，干扰因素多，故现在大多用等电点蛋白标准来做pH梯度的测定。只要将等电点蛋白标准溶解后和样品一样加在凝胶上。聚焦电泳结束后，根据蛋白标准的pI做出pH标准曲线。再根据未知样品的位置就可在标准曲线上查得它的pI。现在可供选择的等电点标准有宽范围，酸性范围和碱性范围，见表6.12。应根据选用的载体两性电解质的pH范围来选择等电点标准。

表6.12 等电点蛋白标准[72]

宽pH范围(pI 3.5～9.3)		低pH范围(pI 2.8～6.5)		高pH范围(pI 5.2～10.3)	
蛋白	等电点	蛋白	等电点	蛋白	等电点
淀粉糖苷酶	3.50	胃蛋白酶原	2.80	β-乳球蛋白A	5.2
甲基红(染料)	3.75	淀粉糖苷酶	3.50	碳酸酐酶B	5.85
胰蛋白酶抑制剂	4.55	甲基红(染料)	3.75	碳酸酐酶B	6.55
β-乳球蛋白A	5.20	葡糖氧化酶	4.15	肌球蛋白,酸性	6.85
碳酸酐酶B(牛)	5.85	胰蛋酶抑制剂	4.55	肌球蛋白,碱性	7.35
碳酸酐酶B(人)	6.55	β-乳球蛋白A	5.20	Lentil 酸性	8.15
肌球蛋白,酸性带	6.85	碳酸酐酶B(牛)	5.85	Lentil 中性	8.45
肌球蛋白,碱性带	7.35	碳酸酐酶B(人)	6.55	Lentil 碱性	8.65
Lentil 酸性	8.15			胰蛋白酶原	9.30
Lentil 中性	8.45			细胞色素c	10.25
Lentil 碱性	8.65				
胰蛋白酶原	9.30				

在含有尿素的凝胶中等电点蛋白标准带的位置不能和无尿素的凝胶中的位置比较，只有在相同条件下，蛋白带的位置才能互相比较。

在含尿素的凝胶上用表面电极测量的表观等电点值和pH梯度也不能和在无尿素的凝胶上测得的值相比较，这不仅是因为蛋白质构象的变化引起表面电荷的变化，而且尿素也大大影响蛋白和载体两性电解质的p*K*值而导致蛋白质等电点和pH梯度范围的变化。而且这种误差还会通过尿素对玻璃电极的影响而被引入。为此，Gelsema等[73]曾对含有尿素和乙醇的凝胶中蛋白质的等电点的测定数据进行了校正，见表6.13。最近Watts等[74]用几个多肽作为在含8mol/L尿素和

2%NP-40 的凝胶中测定等电点的标准，得到的标准曲线线性良好，与表面电极测得的曲线斜率一致。它们是 peptides N-procalcitonin fragment 1-57（pI 3.98），Gln-amyloid β-protein fragment 1-28（pI 5.76），gastric inhibitorg polypeptide（pI 7.14），parathyroid hormone fragment 1-34（pI 8.64）和 human β-endorphin（pI 9.49）。

表 6.13　尿素对 pH 测定的影响[73]

pH	3.0	3.5	4.0	4.5	5.0	5.5	6.0
Δ	+0.09	+0.08	+0.08	+0.07	+0.06	+0.06	+0.05
pH	6.5	7.0	7.5	8.0	8.5	9.0	9.5
Δ	+0.05	+0.05	+0.06	+0.06	+0.06	+0.06	+0.05

注：尿素对 pH 的影响与尿素的浓度成比例，表中数据是对 1mol/L 尿素而言。

蛋白质的等电点也可以通过 Henderson-Hasselbalch 公式计算得到[75]。Henriksson 等[76]用 pK_a 值的扩展计算了 pH3.4～11 的 16 种蛋白质的等电点。计算值与实验值吻合良好。但他们也指出，由于蛋白质的等电点值受其三维结构的影响，所以在有尿素存在时，计算值与实验测得的数据是有很大差别的。

6.4.11　聚焦后的检测

6.4.11.1　各种染色方法

由于等电聚焦后，一般样品均保持原有的生物活性，所以4.2.4节中用于常规聚丙烯酰胺凝胶电泳的各种检测方法如考马斯亮蓝染色、银染色、同工酶染色、专一蛋白染色、荧光标记以及免疫方法均适用于等电聚焦后的检测。只是在等电聚焦凝胶中的载体两性电解质会与一些蛋白质形成不溶性化合物而影响染色和脱色，所以等电聚焦后，凝胶背景不易脱净。为此，等电聚焦后的凝胶应该用三氯醋酸和/或磺基水杨酸先进行固定，再用脱色液洗去酸溶性的载体两性电解质，然后染色。而且由于载体两性电解质有螯合金属离子的作用，如在染色液中加适量的硫酸铜也会有利于背景脱色。另外，醇溶剂和较高的温度（如 60℃）有利于染料-载体两性电解质复合物的溶解，故加温，搅拌可以缩短脱色时间。脱色液中应该有足够量的醇，这对反复使用的脱色液应特别注意，因为在放置和处理过程中醇会挥发。Righetti 在“*Isoelectric focusing: theory, methodology and applications*”一书中对上述各种染色方法做了详细的介绍[77]。

Nadano 等[78]使用一步 G-250 染色方法（同时固定，染色和脱色）对碱性核糖核酸酶进行染色，具有与 R-250 相同的灵敏度。作者也使用一步 G-250 染色方法对大米种子中的醇溶蛋白等电聚焦后进行染色，得到比 R-250 染色方法满意的结果[70]。

由于等电聚焦的高分辨特性，使用同工酶检测比常规蛋白染色更有利于结果的分析，因为只有被检测的酶带才能显色，而且同工酶染色有时更为简单[79~82]，如上述的碱性磷酸酶可用含有底物 RNA 和溴化乙锭（EB）的琼脂糖干膜覆盖在凝胶上进行检测[78]。果胶酯酶（pectinesterase）[83]能用钌红（ruthenium red）快速而灵敏地检测。糖苷酶和糖基转移酶可利用葡萄糖、果糖、甘露糖等的释放活性来测定[84]。酯酶检测的方法很多[85~87]。磷酸葡萄糖变位酶和醇脱氢酶的检测可用于杂交蔬菜种子基因纯度检测的依据[88]。

作者利用同工酶染色技术曾检测不同种鱼、羊、蜜蜂[86]等的各种同工酶，以对它们的分类遗传变异进行研究。同时利用不同类型化合物对酯酶同工酶活性的抑制程度研究药物的毒理作用[85]和寻找棉蛉虫和烟青虫的种群分化及遗传相关性[87]，酯酶检测的方法很多，作者曾使用两种方法。

1）染色剂：坚固牢蓝 RR 250mg 溶于 250ml 0.1mol/L 磷酸缓冲液（pH5.5）中。

底物：1%α-乙酸萘酯（溶于 70%乙醇）3.75ml 和 2%β-乙酸萘酯（溶于 70%乙醇）6ml。

将等电聚焦后的凝胶迅速置于上述底物和染色剂的混合溶液中，20℃保温 30 分钟。显色后用蒸馏水漂洗。

2）染色剂：快蓝 RR（fast blue RR）100mg 溶于 0.1mol/L，pH6.7 的 100ml 磷酸缓冲液中。

底物：α-乙酸萘酯和 β-乙酸萘酯各 50mg 溶于 2ml 丙酮中，将等电聚焦后的凝胶迅速置于上述染色剂和底物的混合液中，37℃保温 10～30 分钟，显色后用蒸馏水漂洗。

荧光染色和免疫固定也是等电聚焦后常用的检测方法。作者[82]用发荧光的伞形化合物检测酯酶 D 和酸性磷酸酶。免疫固定（immunofixation）又称免疫转移（immunotransfer）是将含有抗体的滤纸，醋酸纤维素膜或琼脂糖凝胶直接铺在等电聚焦后的聚丙烯酰胺凝胶上，保温，并进行蛋白染色。作者[89]曾利用这个技术研究了北京地区汉人血清 Gc 亚型的频率分布。

6.4.11.2 扫描与定量

由于等电聚焦的高分辨率，常呈现密集的蛋白带，所以凝胶扫描不仅对定量分析是必需的，甚至对蛋白带的辨认也是十分有用的。由于激光光源的强度大，单色性好，所以对等电聚焦谱的扫描是最合适的。Sϕndergaard 等[90~92]对小麦的等电聚焦谱扫描后进行了神经网络分析，这对等电聚焦谱的数据处理和数据库的建立有很大的帮助。作者通过对人血清中触珠蛋白电泳图谱的扫描分析和数据处理尝试了这方面的工作[93]。

6.4.11.3 电泳转移

等电聚焦后，先转移再染色，可以提高工作效率，因为一块凝胶上的蛋白带

可以转移到多层硝酸纤维素膜上分别处理。而且对膜进行染色有时比直接用凝胶染色更容易、更快和更灵敏。如用等电聚焦和外源凝集素亲和转移对免疫球蛋白G的多种临床检测有十分重要的意义[94,95]。详见第11章。

6.4.11.4 双向电泳

请参见第8章。

6.4.11.5 滴定曲线

请参见第9章。

6.4.12 聚焦过程中出现的问题及解决办法

6.4.12.1 聚丙烯酰胺凝胶等电聚焦

聚丙烯酰胺凝胶等电聚焦不论在制胶、电泳和染色过程中都比常规聚丙烯酰胺凝胶电泳和SDS电泳有较多的技术问题需要解决，如制胶不易聚合，电泳时易烧胶，脱色时背景不易脱净等。但是只要掌握等电聚焦技术的原理，就能解决这些问题而得到高分辨和满意的结果。

(1) 凝胶聚合不佳，胶软，黏

1) 系统中使用的试剂和水不纯（应该用双蒸水配制溶液）。
2) 系统中有醇、巯基化合物或灰尘影响聚合。
3) 凝胶浓度和交联度太低（有时是由于丙烯酰胺或甲叉双丙烯酰胺溶解不佳造成的）。
4) 过硫酸铵（粉末或溶液）和TEMED保存期太长，不能起催化作用。
5) 单体贮液保存期太长，或抽气不充分。
6) 聚合时温度太低，最好在30～40℃聚合。
7) 如用核黄素催化的光聚合，应使用近紫外的光源，如荧光灯，不要用钨灯泡。并采用尽可能薄的玻璃，不要用塑料板。
8) 核黄素在碱性pH范围不能催化光聚合。

(2) 接通电源后没有电流，电流太低或电流随电泳增加

1) 如果接通电源后没有电流，也没有电压，应检查外线电源是否正常工作？电源的保险丝是否好？电源和电泳槽的连接插头是否已插好？
2) 如果仅仅没有电流或电流很小，应检查凝胶、电极条与电极之间的接触是否良好？
3) 检查电极条上的电极液是否充分？
4) 如果在等电聚焦过程中，电压逐渐下降，电流逐渐上升，应检查电极或电极液是否阴、阳极错置？

(3) 接通电源后电流太高或在电泳过程中电流突然升高

1) 电流太高通常是由于在凝胶或样品中有过量的盐。

2) 电流突然升高是烧胶(原因下述)的前奏，应立即关掉电源。

(4) 等电聚焦过程中冷凝水的出现

等电聚焦过程中出现冷凝水虽然是常见现象，但它是烧胶的征兆，所以应予密切注意。

1) 如果在整块胶面上出现冷凝水是由于功率(电压)设置太高或由于冷却不充分。应重新设置温度，检查循环冷却水的运行，凝胶与冷却板的接触。在夏天时，冷却温度不要设置太低，以免潮湿空气凝聚在凝胶周围。

2) 在加样上方出现冷凝水，说明加样过多或样品中有盐。

3) 电极沿边的冷凝水常常是由于过多，过浓的电极液造成的，有时还因此而引起在凝胶上的压痕。

4) 在凝胶的碱性侧或阴极沿边出现冷凝水通常是由于凝胶介质的电内渗引起的。

5) 在凝胶的部分位置出现冷凝水是由于凝胶与冷却板之间有气泡，接触不好。

6) 如果在凝胶上一条线区域出现冷凝水可能是由于载体两性电解质在此 pH 范围的导电性不佳引起的，特别是使用窄 pH 范围的电解质。过长的聚焦时间可能也是原因。

(5) 打火花和烧胶

凝胶上出现冷凝水是打火花和烧胶的前奏，所以要避免冷凝水的出现。

1) 如果烧胶是沿着电极条边缘，可能是由于电极条太长。电极条应比凝胶短几毫米。

2) 如果烧胶是沿着阴极条边缘，可能是由于凝胶介质较长时间与碱性电极液接触而水解。如果样品数目多，最好先加样，后加阴极电极条。

3) 如果在 pH7 纯水区烧胶，应在制胶时加适量 pH3～10 或 pH6～8 的载体两性电解质。

(6) 不能得到预期的 pH 梯度

1) 电泳过程中产生梯度漂移，也称平台现象，可能是由于介质中丙烯酸引起阴极漂移所致。

2) 单体贮液贮存时间太长。

3) 聚焦时间太长。

4) 载体两性电解质导电性不均匀。

(7) pH 梯度的碱性部分被丢失

1) 凝胶溶液吸收了大气中的二氧化碳。

2) 凝胶介质的电内渗。

3) 在电泳时，载体两性电解质和电极液被氧化。

(8) pH梯度呈波纹状

1）凝胶聚合时加过多的过硫酸铵。
2）电极液保存时间太长，电极液太多，不均匀。
3）凝胶，电极条，电极液接触不好。
4）电极丝不直或不干净。
5）尿素胶贮存时间太长。
6）如果波纹主要在加样位置，说明蛋白浓度太高或样品中有较高浓度的盐。

(9) 蛋白带的拖尾和纹理现象（见图4.15和4.16）

1）样品溶解不好，有沉淀颗粒。
2）加样器或加样滤纸片在凝胶上放置时间太长。
3）样品放置时间太长或已变性。
4）样品分子质量大，堵塞凝胶。

(10) 蛋白带偏斜（见图4.17）

1）凝胶不成规则的矩形或正方形。
2）阴、阳电极条长度不一致。
3）电极或电极条的放置不平行。

(11) 蛋白带不细窄

1）低分子质量蛋白在等电聚焦时不能在凝胶介质中聚焦。
2）聚焦时间不够。
3）聚焦后没有及时或没有充分固定。
4）在碱性侧可能是由于pH梯度的原因。

(12) 蛋白带丢失

1）蛋白浓度太低。
2）样品由于电泳时的温度或加样位置的pH而发生沉淀。
3）样品被吸附在加样滤纸上或加样滤纸孔径太小，分子不能进入凝胶。
4）加样位置太靠近等电点，或分子太大，或加样时场强太大，蛋白分子无法进入凝胶。
5）染色方法不灵敏。
6）染色前，蛋白分子没有被固定。
7）脱色时，蛋白分子被溶在脱色液中。

(13) 一些蛋白带聚焦在错误位置

1）蛋白分子形成复合物。
2）丢失配体。

(14) “一种”蛋白聚焦成几条带

1）蛋白分子被解聚，被水解或形成复合物。
2）样品在准备，保存或电泳期间被氧化。

3）蛋白分子的寡聚物或部分基团的不同结合。
4）酶的不同程度的磷酸化作用、甲基化作用或乙酰化作用。
5）糖蛋白的糖残基不同。
6）样品在含有尿素时产生氨基甲酰化作用。

（15）“微笑”与“皱眉”现象（见图 4.14）

“微笑”与“皱眉”现象同属于边缘效应。

1）凝胶的边缘与中间的温度分布和电场强度不同。
2）放置一段时间后，凝胶边缘的浓度高于中间的浓度。

（16）背景脱色不净

1）在固定后漂洗时，载体两性电解质没有被完全洗去。
2）染料质量不好，未充分溶解。
3）染色液浓度太大。

（17）凝胶和支持膜表面有染料沉淀

染料沉淀来自于三氯醋酸和载体两性电解质的复合物。可在染色后，脱色前在脱色液中用湿棉花轻轻擦去。

（18）凝胶从支持膜上脱落

1）三氯醋酸太浓，固定时间太长。
2）温度太高，振摇太激烈。
3）支持膜质量不好。

（19）蛋白带在染色和保存过程中丢失

1）改变染料，脱色液或染色方法。
2）降低保存液中甘油的浓度。

6.4.12.2 琼脂糖凝胶等电聚焦

（1）凝胶强度不够

1）凝固时间不够。最好灌注后 1 小时取出凝胶，再在保湿盒中置 4℃过夜。凝胶可保存一周。
2）浓度不够。琼脂糖应放在室温，密封保存，以防吸水。
3）尿素会破坏琼脂糖的结构，所以此时凝胶浓度最好为 2%。

（2）等电聚焦时凝胶表面有水

1）从冰箱中取出时，先用滤纸吸干凝胶表面的水。
2）凝胶凝固时间太短。
3）电极液浓度太大。应该使用比聚丙烯酰胺凝胶等电聚焦时弱的酸和碱。
4）电极条上的电极液过多。
5）电内渗所致，必须使用无电内渗琼脂糖。
6）如果在靠近阴极侧有水，是由于电内渗所致。

7）如果在加样位置有水，说明蛋白浓度太高，样品有盐，或加样滤纸有电内渗。

（3）在加样位置有压痕

1）加样时电场强度太大。

2）过量加样。

3）凝胶强度不够。

（4）等电聚焦时凝胶变干

1）强电内渗使靠近阳极侧变干。

2）凝胶厚度不均匀，薄的位置干掉。

3）空气太干燥。

4）电泳槽旁有热源。

（5）打火花

1）凝胶干了。

2）电压过高。

3）凝胶表面有水。

（6）蛋白带太宽

过量加样使邻近样品泳道混在一起。

（7）蛋白带不细窄

1）聚焦时间不够。

2）聚焦时间过长，阴极漂移所致。

3）因为琼脂糖凝胶孔径大，易在等电聚焦时扩散。

（8）蛋白带丢失

同聚丙烯酰胺凝胶的原因，且在碱性 pH 范围丢失带的现象更严重。

（9）“微笑”、“皱眉”和蛋白带偏斜现象

同聚丙烯酰胺凝胶等电聚焦的原因。

（10）蛋白带的拖尾和纹理现象比使用聚丙烯酰胺凝胶时减轻，因为琼脂糖凝胶孔径大

（11）染色时的一些问题同聚丙烯酰胺凝胶，但脱色比较容易

参考文献

[1] Righett P G. “Immobilized pH gradients: theory and methodology” Elsevier Amsterdam. 1990. 9

[2] 郭尧君. 生物物理学报. 1988（4）：389～391

[3] Rilbe H. Ann. N. Y. Acad. Sci.，1973（209）：11～22

[4] Vesterberg O，Svensson H. Acta Chem. Scand.，1966（20）：820～834

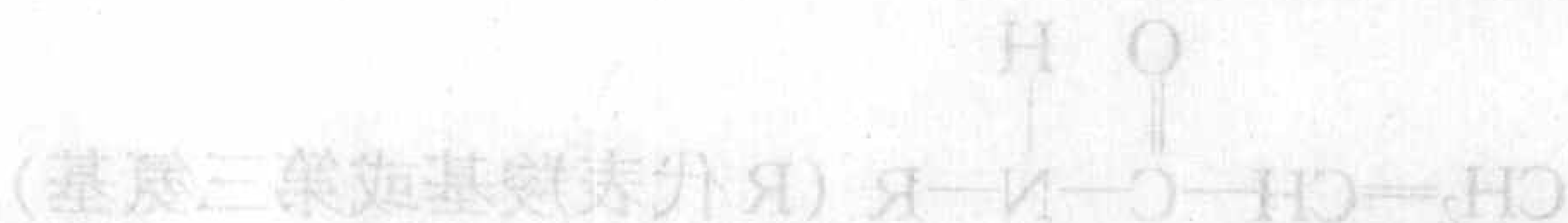
[5] Righetti P G. Isoelectric Focusing：Theory，Methodology and Applications. Elsevier，Amsterdam. 1983. 46

[6] Righetti P G. Isoelectric Focusing：Theory，Methodology and Applications. Elsevier，Amsterdam. 1983. Preface

[7] Ikeda K, Suzuki S. 1912 U. S. Patent 1 015 891.
[8] Svensson H. In: Advances in Protein Chemistry. Acedemic Press, New York. 1948. IV, 251～295
[9] Kolin A. J. Chem. Phys., 1954 (22): 1628～1629
[10] Kolin A. J. Chem. Phys., 1955 (23): 407～410
[11] Kolin A. Proc. Natl. Acad. Sci., USA 1955 (41): 101～110
[12] Kolin A. In: Methods of Biochemical Analysis. Wiley, Interscience, New York. 1958. 6, 259～288
[13] Svensson H. Acta Chem. Scand., 1961 (15): 325～341
[14] Righetti P G. Isoelectric Focusing: Theory, Methodology and Applications. Elsevier, Amsterdam. 1983. 33
[15] Gelsema J W, De Ligny C L. J. Chromatogr., 1979 (178): 550～554
[16] Gelsema J W, De Ligny C L, Van Der Veen N G. J. Chromatogr., 1979 (173) 33～41
[17] Bianchi Bosisio A, Snyder R S. Righetti P G. J. Chromatogr, 1981 (209): 265～272
[18] Williams K W, Söderberg L. Int. Lab 1979 (Jan/Febr): 45～53
[19] Söderberg L, Buckley D, Hagström G, Bergström J. Prot. Biol. Fluids, 1980 (27): 687～691
[20] Pogacar P, Jarecki R. In: Electrophoresis and Isoelectric Focusing in Polyacrylamide Gel. de Gruyter, Berlin. 1974. 153～158
[21] Grubhofer N, Borja C. In: Electrofocusing and Isotachophoresis. de Gruyter, Berlin. 1977. 111～120
[22] Vinogradov S N, Lowenkron S, Andonian H R, Bagshaw J, Felgenhauer K, Park S J. Biochem. Biophys. Res. Commun., 1973 (54): 501～506
[23] Charlionet R, Martin J P, Sesboöé R, Madec P J, Lefebvre F. J. Chromatogr, 1979 (176): 89～101
[24] Charlionet R, Morcamp C, Sesboüé R, Martin J P. J. Chromatogr., 1981 (205): 355～366
[25] Just W W. Anal. Biochem., 1980 (102): 134～144
[26] 中国科学院微生物研究所，酶结构与功能研究组．生物化学与生物物理进展，1979 (2): 56
[27] Haglund H. In: Isoelectric Focusing. Butterworths, London. 1975. 3～22
[28] Radola B J. Electrophoresis, 1980 (1): 43～56
[29] Righetti P G. Isoelectricfocusing: theory, methodology and applications. Elsevier Biochemical 1983. 73～75
[30] Righetti P G. Separ. Purif. Methods, 1975 (4): 23～72
[31] Westerberg O. in Protides of the Biological Fluids Ed. by H. Peters. Pergamon Press 1969. 383
[32] Nilsson P, Wadström T, Vesterberg O. Biochim Biophys. Acta., 221 1970.146
[33] Vesterberg O. Sci. Tools, 1969 (16): 24～27
[34] Brown W D, Green S. Anal. Biochem., 1970 (34): 593～595
[35] Fawcett J S, Dedman M L, Morris C J O R. FEBS Letters 1969 (3): 250
[36] Galante E, Caravaggio T, Righetti P G. In: Progress in Isoelectric Focusing and Isotachophoresis. Elsevier, Amsterdam. 1975. 3～12
[37] Christensen J J, Hill J O, Izatt M R. Science, 1971 (174): 459～467
[38] 郭尧君．分析测试通报．1984 (3): 62～70
[39] 郭尧君．生物化学与生物物理进展，1983．(3): 50～55
[40] 郭尧君，中国专利 No.98218854.4，1998
[41] Guo Y J, Li X H, Huang L L. Electrophoresis, 1996 (17): 537～539
[42] Users Manual of Multiphor Ⅱ. Electrophoresis System Pharmacia LKB. Biotechnology AB Uppsala, Sweden 1992, 70～86
[43] Amershem Biosciences 公司 2004 年目录 387 页

[44] Gwo Y J, Li X H, Fang Y. Electrophoresis, 1998 (19) 1131～1134
[45] Sararis C A, Zamcheck N J. Immun. Methods, 1979 (29): 91～96
[46] Andrews A T. Electrophoresis: Theory, Techniques and Biochemical and Clinical Applications, Clarendon Press, Oxford. 1981. 182～206
[47] Chiari M, Micheletti C et al. Electrophoresis, 1994 (15): 177～186
[48] Chiari M, Righetti P G. Electrophoresis, 1995 (16): 1815～1829
[49] Harrington M G, Lee K H, Bailey J E et al. Electrophoresis, 1994 (15): 187～194
[50] Harrington M G, Zewert T E. Electrophoresis, 1994 (15): 195～199
[51] Charlionet R, Levasseur L, Malandain J J. Electrophoresis, 1996 (17): 58～66
[52] 郭尧君"薄层电聚焦"在何忠效，张树政，郭尧君"等电聚焦". 北京：科学出版社. 1985. 81～93
[53] Delincée H, Radola B. J. Anal Biochem 1978 (90): 609～623
[54] 陈红，郭尧君，颜茂功等. 生物物理学报，1990 (6) 463～466
[55] Lyubimova T, Caglio S, Gelfi C et al. Electrophoresis, 1993 (14): 40
[56] Lyubimova T, Righetti P G. Electrophoresis, 1993 (14): 191
[57] Righetti P G, Bossi A, Giglio M et al. Electrophoresis, 1994 (15): 1005～1013
[58] Rabilloud T, Vincon M, Garin J. Electrophoresis, 1995 (16): 1414
[59] Rabilloud T, Girardot V, Lawrence J J. Electrophoresis, 1996 (17): 67
[60] Rabilloud T. Electrophoresis, 1996 (17): 813～829
[61] Watrin J E, Miller R A. Anal. Biochem., 1970 (34): 424
[62] Guo Y. Bishop R J. Chromatography, 1982 (234): 459～462
[63] 郭尧君，曹泳清，文镜. 生殖与避孕，1985 (5): 17～22
[64] Currie D J et al. Polymer, 1965 (6): 451～453
[65] Jordan E M, Raymond S. Anal. Biochem., 1969 (27): 205
[66] Nguyen N Y, Chramback A. Anal. Biochem., 1977 (82): 226～235
[67] Karlsson C, Davies H et al. LKB Application Note 75 LKB-Produkter AB. Bromma Sweden. 1973
[68] Creighton T E. J. Mol. Biol., 1979 (129): 235～264
[69] Righetti P G, Chillemi F J. Chromatogr, 1978 (157): 243～251
[70] Guo Y J. Bishop R et al. Cereal Chemistry, 1986 (63): 1～3
[71] Hoffman W L, Jurnp A A, Kelly P J. et al. Electrophoresis, 1989 (10): 741～747
[72] Amersham Bio-Sciences 公司 2004 年目录 409 页
[73] Gelsema W J, DeLigny C L et al. J. Chromatogr, 1979 (171): 171～181
[74] Watts N R M, Singh R P. Electrophoresis, 1995 (16): 22～27
[75] Righett P G. "Immobilized pH gradients: theory and methodology" Elsevier Amsterdam. 1990. 54～56
[76] Henriksson G, Englund A K, Johansson G et al. Electrophoresis, 1995 (16): 1377～1380
[77] Righetti P G. "Isoelectric focusing; theory methodology, applications" Elsevier, Amsterdam 1984. 204～225
[78] Nadano D, Yasuda T, Sawazaki K et al. Electrophoresis, 1996 (17): 104～109
[79] 刘如笋，郭尧君. 动物学报，1985 (31): 20～213
[80] 郭尧君，李辛晖，黄力力等. 生物化学与生物物理进展，1995 (22): 559～562
[81] 郭尧君，夏邦颖，郭邪. 蚕业科学，1984 (10): 236～238
[82] Guo Y J, Huang L L, Yao X G et al. Electrophoresis, 1996 (17): 535～536
[83] Alonso J, Rodrignez M T, Canct W. Electrophoresis, 1995 (16): 39～42
[84] Mukasa H, Tsumori H, Uezono Y et al. Electrophoresis, 1994 (15): 255～259

[85] 周厚安，郭尧君，王恩文等. 动物学集刊，1985（3）：15～21
[86] 林桂莲，郭尧君等. 中国农业科学，1987（1）：20
[87] 阎一林，郭尧君，钦俊德. 昆虫学报，1987（30）：341～345
[88] Burg H C J，Berg. B M V d. Electrophoresis, 1996（17）：502～504
[89] 郭尧君，郭强，黄力力等. 生物化学与生物物理进展，1994（21）：356～359
[90] Sφndergaard I，Jensen K，Krath B N et al. Electrophoresis, 1994（15）：584～588
[91] Jensen K，Sφndergaard I，Skovgaard I M. Electrophoresis, 1995（16）：921～926
[92] Kesmir C，Sφndergaard I，Jensen K. Electrophoresis, 1995（16）：927～933
[93] 方勇，郭尧君，李晓斌. 生物物理学报，1998（14）：583～587
[94] Kötz K，Hönsler M，Sautr H et al. Electrophoresis, 1996（17）：533～534
[95] Hänsler M，Kötz K，Häntzschel H. Electrophoresis, 1995（16）：811～812



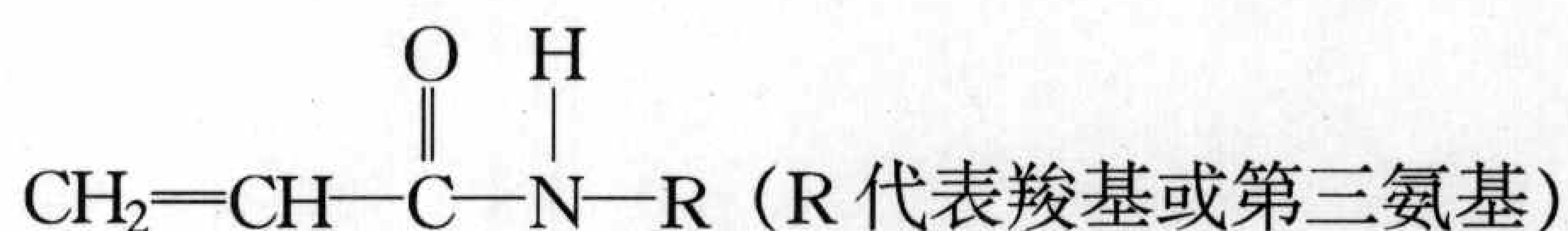
第 7 章　固相 pH 梯度等电聚焦

固相 pH 梯度等电聚焦（Immobilized pH gradients isoelectric focusing, IPGIEF）是 80 年代建立起来的一种新型等电聚焦技术。它利用一系列具有弱酸或弱碱性质的丙烯酰胺衍生物滴定时，在滴定终点附近形成 pH 梯度并参与丙烯酰胺的共价聚合，从而形成固定的，不随环境电场等条件变化的 pH 梯度。该方法具有比传统载体两性电解质等电聚焦（第 6 章）更高的分辨能力，更大的上样量。分辨率可达 0.001pH，是目前分辨率最高的电泳方法，可用于分析和制备等电点极其相近的蛋白质和多肽，是目前惟一可以分析只有一个氨基酸差别的两种蛋白质的电泳方法。

7.1　原　　理

7.1.1　固相 pH 梯度介质的结构和合成

固相 pH 梯度所用的介质是一些具有弱酸或弱碱性质的丙烯酰胺衍生物，它们与丙烯酰胺和甲叉双丙烯酰胺具有相似的聚合行为。原瑞典 LKB 公司（现为 GE 医疗集团，安玛西亚公司）的商品名为 Immobiline。瑞士 Fluka 公司的商品名为 pI Select。它的结构式是：



Immobiline 分子的一端是一个双键，它可以在聚合过程中通过共价结合镶嵌到聚丙烯酰胺介质中。所以即使在电场中，它也是“固相”的。在分子的另一端是一个缓冲基团 R，R 为弱酸或弱碱，它可在聚合物中形成弱酸或弱碱的缓冲体系（见图 7.1）。利用缓冲体系滴定终点附近一段 pH 范围就可形成近似线性的 pH 梯度。所以固相 pH 梯度与载体两性电解质 pH 梯度的区别在于前者的介质不是两性分子，在凝胶聚合时便形成 pH 梯度。后者是两性分子，在电场中两性分子迁移到自己的等电点才形成 pH 梯度。

作为固相 pH 梯度介质的丙烯酰胺衍生物（immobiline）的合成是基于 Gasparic、Bjellqvist 和 Rosengren 的专利[1]。Bjellqvist[2]和 Righetti[3]对合成过程做了详细的介绍。它们的基本结构是在分子的一端含有一个丙烯酰胺残基。在另一端酸性 Immobiline 含有一个弱的羧基，碱性 Immobiline 含有第三氨基。红外光谱

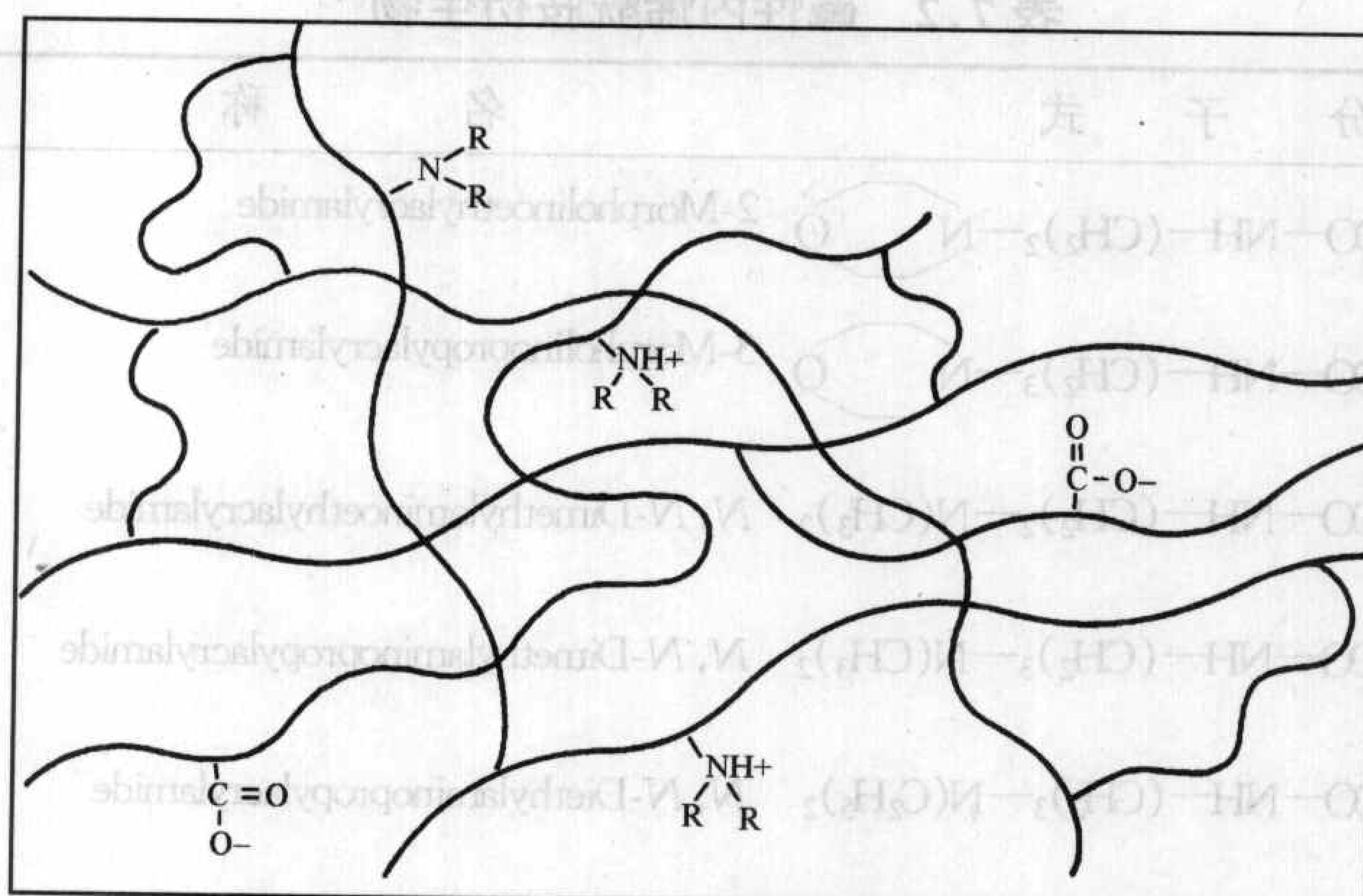


图 7.1 Immobiline

也证实了在所有分子的酰胺键上有羰基。尽管商品 Immobiline 只有 6～7 种，但实验室已经能合成 17 种不同 pK 值的丙烯酰胺衍生物[4]，它们的分子式及分子质量见表 7.1～7.3。

表 7.1 酸性丙烯酰胺衍生物[4]

pK^a	分子式	名称	分子质量(Da)	注
1.0	$CH_2{=}CH{-}CO{-}NH{-}C(CH_3)(CH_3){-}CH_2{-}SO_3H$	2-Acrylamido-2-methylpropane sulfonic acid	207	b
3.1	$CH_2{=}CH{-}CO{-}NH{-}CH(OH){-}COOH$	2-Acrylamidoglycolic acid	145	c
3.6	$CH_2{=}CH{-}CO{-}NH{-}CH_2{-}COOH$	*N*-Acryloylglycine	129	d
4.4	$CH_2{=}CH{-}CO{-}NH{-}(CH_2)_2{-}COOH$	3-Acrylamidopropanoid acid	143	d
4.6	$CH_2{=}CH{-}CO{-}NH{-}(CH_2)_3{-}COOH$	4-Acrylamidobutyric acid	157	d

a: The pK values for the three Immobilines and for 2-acrylamidoglycolic acid are given at 25℃; for AMPS (pK1.0) the temperature of pK measurement is not reported.

b: Polysciences Inc., Warrington, PA 18976, USA.

c: Righetti PG, Chiari M, Sinha PK, Santaniello E. J. Biochem: Biophys. Methods. 1986, 16: 185～192.

d: Pharmacia-LKB Biotechnology, Uppsala, Swden.

表 7.2 碱性丙烯酰胺衍生物[4]

pK^a	分子式	名称	分子质量(Da)	注
6.2	$CH_2{=}CH{-}CO{-}NH{-}(CH_2)_2{-}N\;\;O$	2-Morpholinoethylacrylamide	184	b
7.0	$CH_2{=}CH{-}CO{-}NH{-}(CH_2)_3{-}N\;\;O$	3-Morpholinopropylacrylamide	198	b
8.5	$CH_2{=}CH{-}CO{-}NH{-}(CH_2)_2{-}N(CH_3)_2$	*N*, *N*-Dimethylaminoethylacrylamide	142	b
9.3	$CH_2{=}CH{-}CO{-}NH{-}(CH_2)_3{-}N(CH_3)_2$	*N*, *N*-Dimethylaminopropylacrylamide	156	b
10.3	$CH_2{=}CH{-}CO{-}NH{-}(CH_2)_3{-}N(C_2H_5)_2$	*N*, *N*-Diethylaminopropylacrylamide	184	c
>12[e]	$CH_2{=}CH{-}CO{-}NH{-}(CH_2)_2{-}\overset{+}{N}(C_2H_5)_3$	*N*, *N*, *N*-Triethylaminoethylacrylamide	198	d
>12	$CH_2{=}CH{-}CO{-}NH{-}(CH_2)_2{-}\overset{+}{N}(CH_3)_3$	*N*, *N*, *N*-Trimethylaminoethylacrylamide	153	d

a: All p*K* values(except for p*K* 10.3)measured at 25℃. The value of p*K* 10.3 refers to 10℃.

b: Pharmacia-LKB Biotechnology, Uppsala, Sweden.

c: Sinha PK, Righetti PG, J. Biochem: Biophys. Methods. 1987, 15: 199～206

d: IBF, Villeneuve La Garenne, France.

e: QAE, quaternary aminoethylacrylamide.

表 7.3 一些新合成的丙烯酰胺衍生物[4]

pK^a	分子式	名称	分子质量(Da)	注
6.6	$CH_2{=}CH{-}CO{-}NH{-}(CH_2)_2{-}N\;\;S$	2-Thiomorpholinoethylacrylamide	200	b
6.85	$CH_2{=}CH{-}CO{-}N\;\;N{-}CH_3$	1-Acryloyl-4-methylpiperazine	154	c
7.0	$CH_2{=}CH{-}CO{-}NH{-}(CH_2)_2{-}C{=}N$ (ring: C, C, NH)	2-(4-Imidazolyl)ethylamine-2-acrylamide	165	d
7.4	$CH_2{=}CH{-}CO{-}NH{-}(CH_2)_3{-}N\;\;S$	3-Thiomorpholinopropylacrylamide	214	d
8.05	$CH_2{=}CH{-}CO{-}NH{-}(CH_2)_3{-}N(CH_2CH_2OH)_2$	*N*, *N*-Bis (2-hydroxyethyl)-*N*′-acryloyl-1, 3-diaminopropane	200	e

a: All p*K* values measured at 25℃

b: Chiari M, Righetti PG, Ferraboschi P, Jain T, Shorr R. Electrophoresis 1990, 617～620

c: Chiari M, Ettori C, Manzocchi A, Righetti PG. J. Chromatogr. 1991, 548: 381～392

d: Chiari M, Giacomini M, Micheletti C, Righetti, P. G., J. Chromatogr. 1991, 558: 285～295

e: Chiari M, Pagani L, Righetti PG, Jain T, Shorr R, Rabilloud T. J. Biochem. Biophys. Methods 1990, 21: 165～172

7.1.2 Immobiline的物化特性

正确混合具有不同 pK 的 Immobiline 是得到 pH 梯度重复性的最重要的因素。Immobiline 的 pK 值是随实验条件，如温度、离子强度、溶剂的介电常数等而改变的。其中最重要的参数是温度，如图 7.2 所示，在 10～25℃时，三种弱酸 Immobiline 对温度变化并不灵敏，但 4 种弱碱 Immobiline 的 pK 值有明显变化。Immobiline pK8.5 在此温度范围的 $\Delta pK = 0.44$。为了 pH 梯度的计算和实验的重复性，电泳时应严格控制温度，最好固定在 10℃[2]。

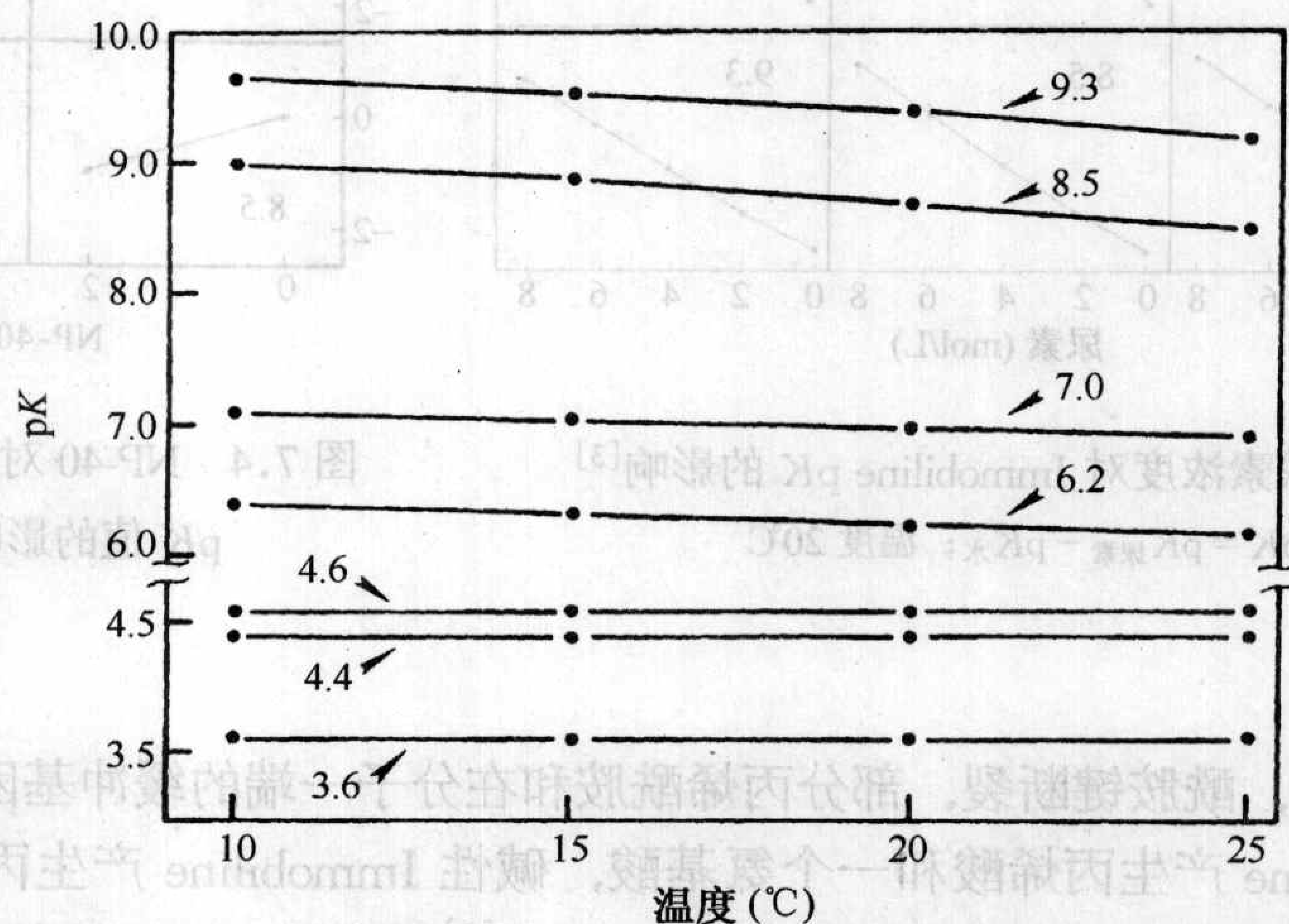
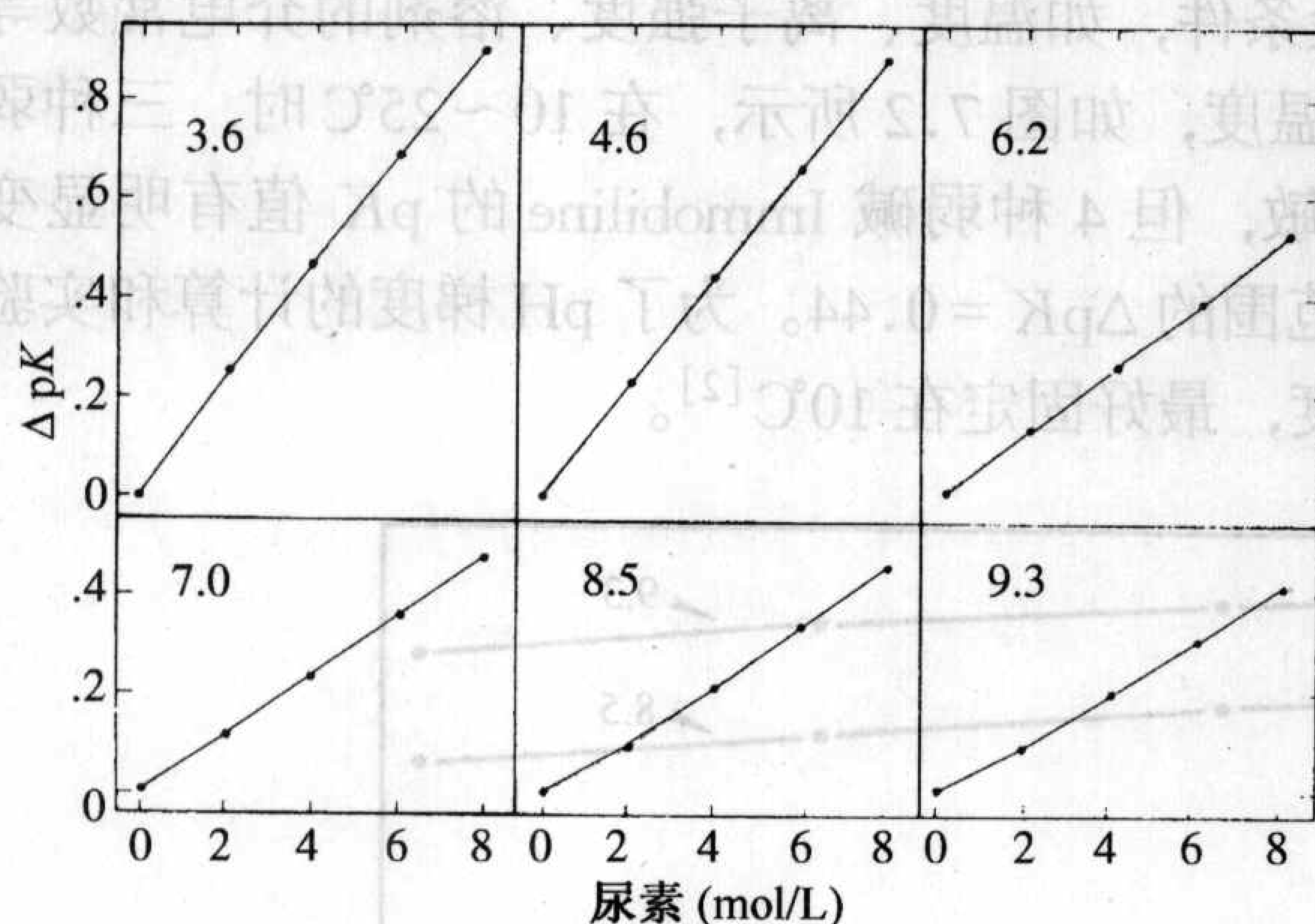


图 7.2　在 10～25℃几种不同 pK Immobiline 的温度系数（d_{pK}/d_T）[3]

除了温度以外，凝胶系统中的添加剂，如尿素，由于改变水的结构和降低介电常数也会改变 Immobiline 的 pK 值，图 7.3 所示 8mol/L 尿素对酸性 Immobiline 的影响比对碱性强。如对 Immobiline pK3.6，增加 0.9pH 单位，但对 Immobiline pK9.3，只增加 0.42pH 单位。所以 Gelfi 和 Righetti[5] 建议，如使用尿素胶时，最好先配制合适 pH 范围的固相 pH 梯度凝胶、漂洗、干燥后再重新用含有尿素的溶液泡胀。

中性或不带电的两性离子去污剂如 NP-40，CHAPS 等对 Immobiline pK 值的影响见图 7.4。2%NP-40 对 Immobiline pK 值的影响是十分小的。对弱酸类约增加 0.08pH 单位，对弱碱类约减少 0.1pH 单位。

自从 Immobiline 被合成，甚至在 LKB 公司提供白色结晶粉末的酸性 Immobiline 和液状的碱性 Immobiline 商品后，在很长一段时间内，它们的不稳定问题始终不能解决，其原因是：



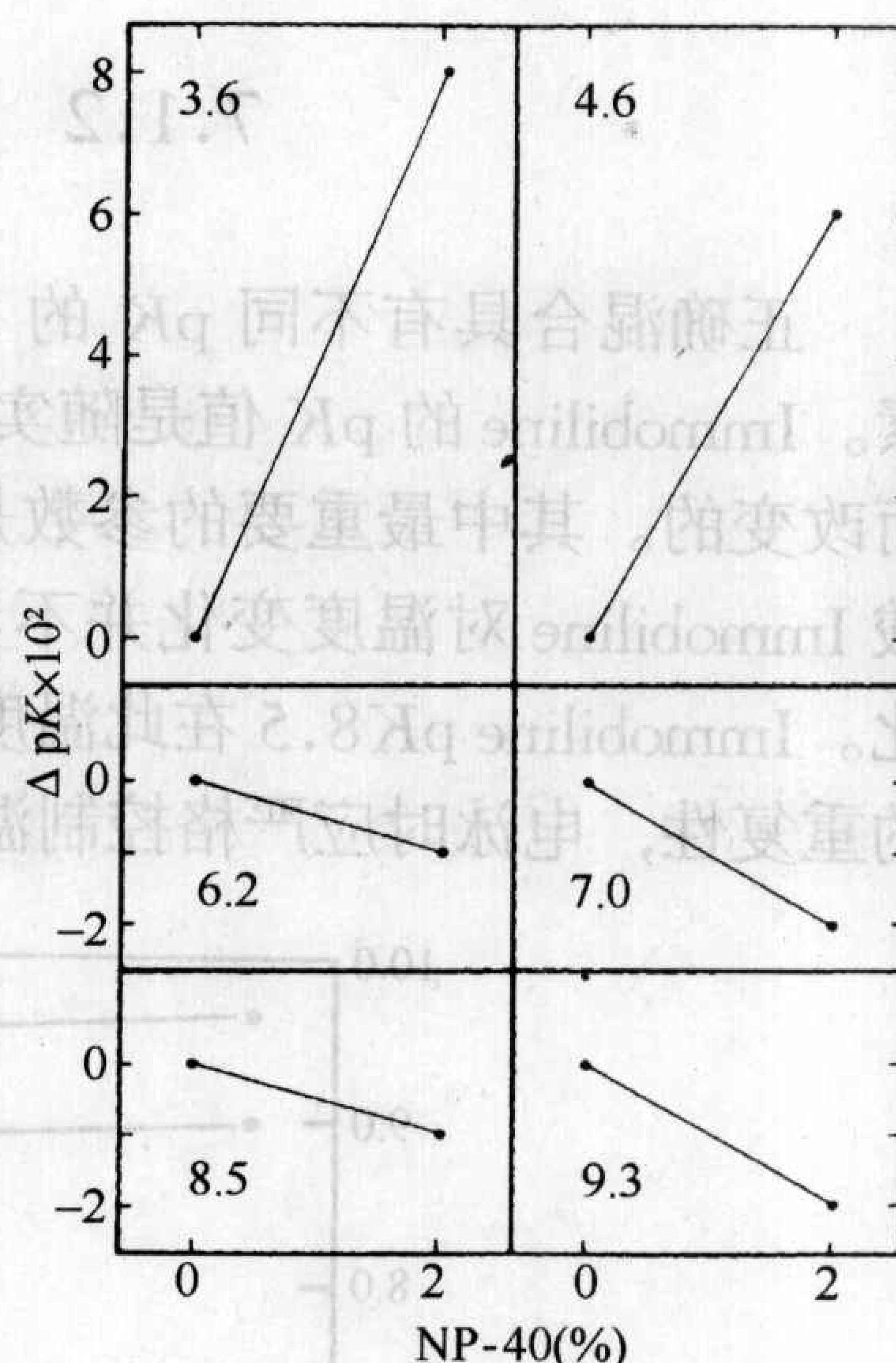


图 7.3　尿素浓度对 Immobiline pK 的影响[3]

$\Delta pK = pK_{尿素} - pK_{水}$；温度 20℃

图 7.4　NP-40 对 Immobiline pK 值的影响[3]

(1) 降解

由于水解，酰胺键断裂，部分丙烯酰胺和在分子一端的缓冲基团被分开，使酸性 Immobiline 产生丙烯酸和一个氨基酸，碱性 Immobiline 产生丙烯酸和一个二胺。这两种情况都会导致实验的失败。Pietta[6]研究了 pH 和温度对 Immobiline 稳定性的影响。结果发现，在 20℃时，Immobiline 在几周内降解。而在 60℃时，只要几天或几小时便降解。pH 的影响是：酸性 Immobiline 的降解主要发生在 pH6～7，碱性则主要在 pH9。在 pH3～4，Immobiline 有最大的稳定性。

(2) 自聚合

碱性 Immobiline 易发生自聚合，自聚合是自动催化的，形成齐（分子质量）聚(合)物（oligomers）和 n-链节（n-mers）而使溶液出现混浊。自聚物甚至会结合到聚丙烯酰胺凝胶中，因为它们在一端仍然有双键。这些二体、三体自聚物会结合到蛋白分子中而使蛋白分子发生严重的沉淀。检测多聚物的实验称为“铁蛋白沉淀检测”（ferritin precipitation test）[7,8]，见图 7.5。由于齐聚物和 n-链节有很强的疏水性，所以可以将它们吸附在疏水聚合物上来除去[8]。

(3) 与 pH 有关的 N-氧化物的形成

上述两种现象虽然主要发生在碱性 Immobiline，但对所有 pK 值的 Immobiline 都有影响，而这第三个现象只发生在碱性范围。当在碱性 pH 范围进行富有半胱氨酸的蛋白的等电聚焦时，第三氨基会发生氧化。这种氧化作用在用过硫酸

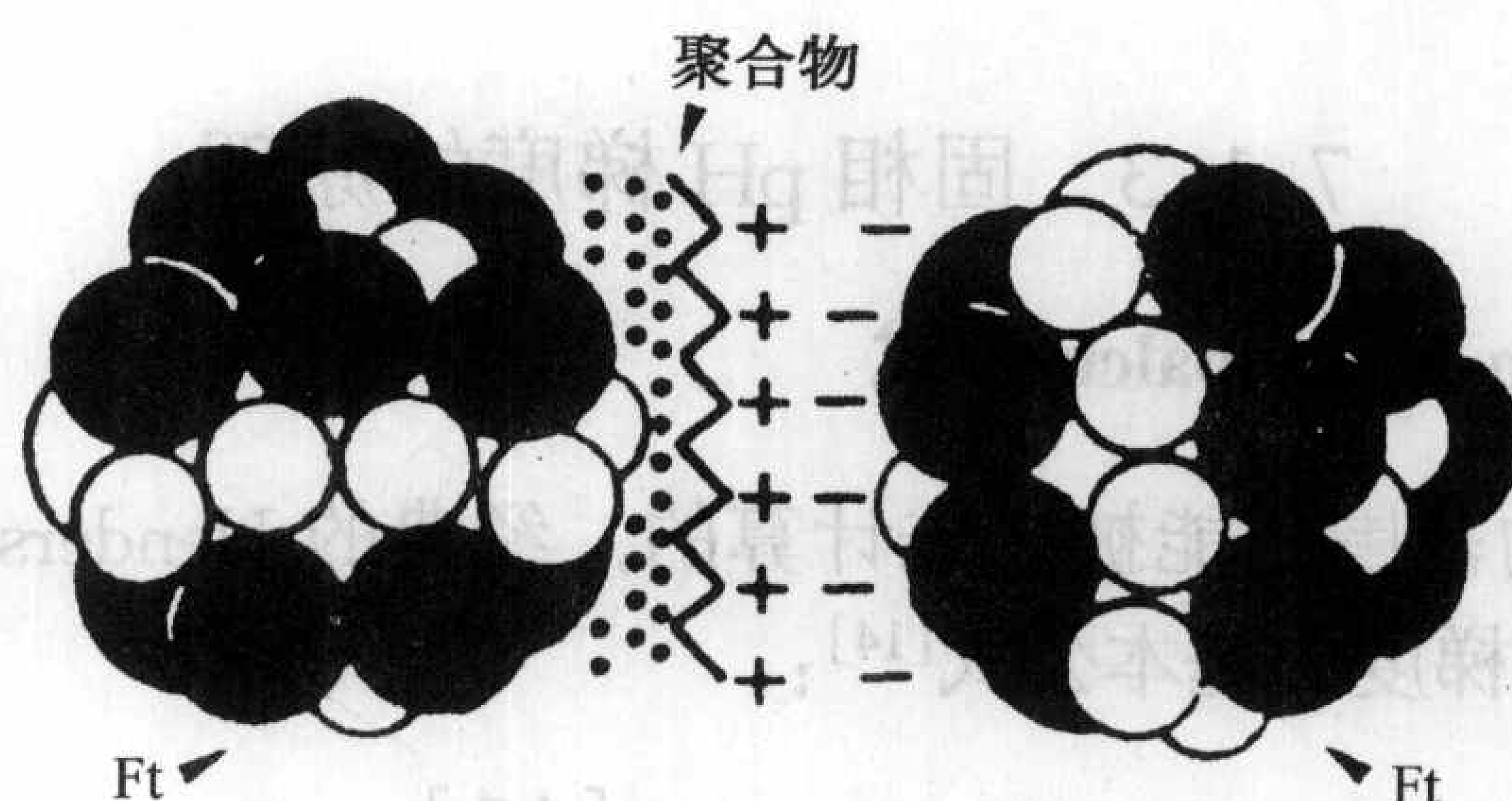


图 7.5　铁蛋白和沉淀 Immobiline 之间的相互作用模式[3]

铵作催化剂时十分严重[9]。即使试剂很纯，也会发生，只是反应较慢。为避免氧化，需将试剂存放在惰性气体中。氧化的 Immobiline 在 320～350nm 有吸收峰。氧化作用也与 pH 有关。虽然在 pH5 时不会发生氧化作用，但凝胶聚合不佳，最好在 pH7 左右聚合，但此时制胶方法应有所改变[9]。

1988 年原瑞典 LKB 公司解决了以上三个问题，推出了 Immobiline Ⅱ。因为酸性 Immobiline 在中、酸性 pH 最稳定[6]，故将其配制成 0.2mol/L 水溶液。并在水溶液中加 5ppm 的抑制剂（对苯二酚-甲基酯），结果是 Immobiline Ⅱ pK3.6 可在 8℃贮存 1200 天，pK4.6 则可贮存 4800 天（以产生 1%丙烯酸计算）[3]。碱性 Immobiline 有较强的不稳定性，将其配制成 0.2mol/L 的 n-丙醇溶液（考虑到开、闭瓶子时，溶液会吸收大气中的水，所以配制成 n-丙醇溶液），结果很稳定，至少可在 4℃保存一年[3]。这首先是因为 n-丙醇的蒸气压和沸点与水几乎相同，而且它可以以任何比例与水混合。第二是由于 n-丙醇的存在降低了介电常数，10%的 n-丙醇只使酸性 Immobiline 位移 +0.07pH 单位，使碱性 Immobiline 位移 −0.12pH 单位。对蛋白质的酸、碱性基团也只有相同数量级的 pH 位移，因此对聚焦蛋白带的位置的影响是十分小的。而且 n-丙醇只在聚合时存在，漂洗时可被洗掉，故对聚焦没有影响。Gåveby（LKB 公司）和 Righetti 及他的同事们成功地解决了上述问题[3]。现在 Righetti 研究组仍在致力于合成各种 pK 值，特别是极酸和极碱的固相 pH 梯度介质，以扩展 pH 梯度和克服沟（gap）的影响[3, 4, 10, 11]。

Immobiline 对蛋白质中氨基酸分析的影响，特别是用于蛋白质纯化时是必须考虑的。实验证明 Immobiline 对此没有影响[13]。因为 85%的 Immobiline 单体已转换成聚合体，而且没有被聚合的自由单体是带电的，它们会迁移到阴极或阳极，再则在制胶时进行多次漂洗，一些不能结合到凝胶介质中的单体或片段应该已被漂洗掉了。

7.1.3 固相 pH 梯度的原理

7.1.3.1 Henderson-Hasselbalch 公式

固相 pH 梯度的范围是能被事先计算的，经典的 Henderson-Hasselbalch（H-H）公式是计算 pH 梯度的基本公式[14]：

$$pH = pK + \log \frac{[A^-]}{[HA]}$$

这里［A^-］是解离物质的摩尔浓度，［HA］是非解离物质的摩尔浓度。H-H 公式和电中性条件给出了 pH 和 Immobiline 总浓度之间的关系。如果仅使用两种 Immobiline，其中一种完全离子化的作为滴定剂，另一种作为缓冲剂，则 pH 就能直接从两种 Immobiline 浓度中计算出来，主要取决于哪一种 Immobiline 作为缓冲基团。如果缓冲基团是酸性 Immobiline，解离常数为 pK_A，它与非缓冲 Immobiline 摩尔浓度分别为 C_A、C_B，则

$$pH = pK_A + \log \frac{C_B}{C_A - C_B}$$

同理，如果缓冲成分是碱性 Immobiline，则

$$pH = pK_B + \log \frac{C_B - C_A}{C_A}$$

7.1.3.2 一个 pH 范围的固相 pH 梯度

图 7.6 是用 0.2mol/L pK3.6 滴定 pK7.0 的 Immobiline。溶液中的自由碱基呈现碱性 pH，最初几滴 pK3.6 的 Immobiline 使 pH 指数性地衰减，接着在 pK7.0±0.5 范围内形成一条逼近线性的滴定曲线，便形成 pH6.5～7.5 的梯度。欲需 pH4.0～5.0 梯度，则可用 Immobiline pK4.6 作为缓冲组分，用 Immobiline pK9.3 去滴定它。这种 1 个 pH 范围的固相 pH 梯度的建立通常采用 $pH_{mid} = pK$ 的方式（pH_{mid}是指设计范围的中点）。此时缓冲组分的 Immobiline 的摩尔浓度是恒定的，斜率为零。非缓冲 Immobiline 的摩尔浓度的改变呈现负斜率。因为当滴定碱性缓冲基团时，它是从酸性变为碱性。缓

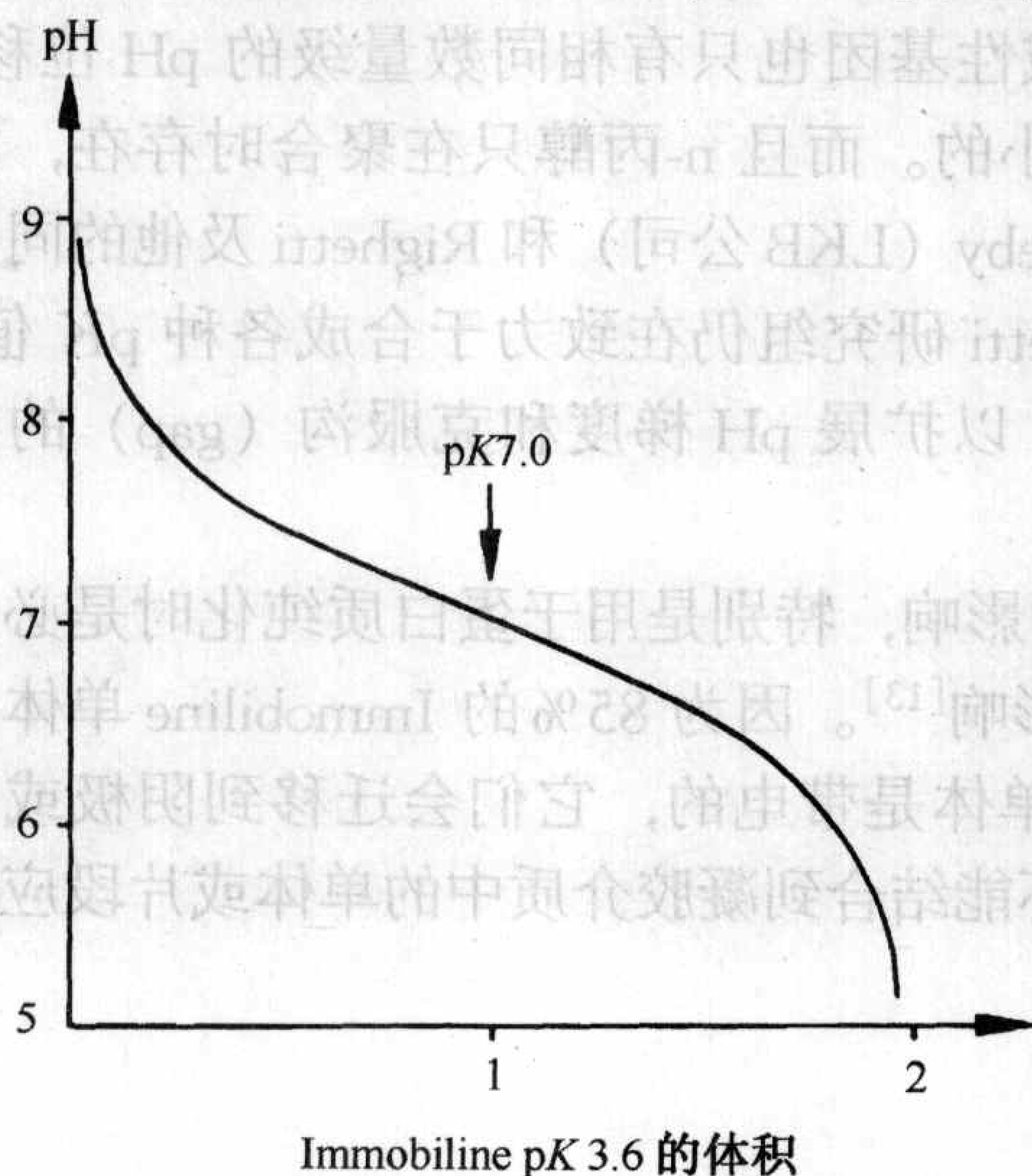


图 7.6 Immobiline 滴定曲线[14]

冲能力（β）在梯度范围内呈现一条对称曲线，见图 7.7。

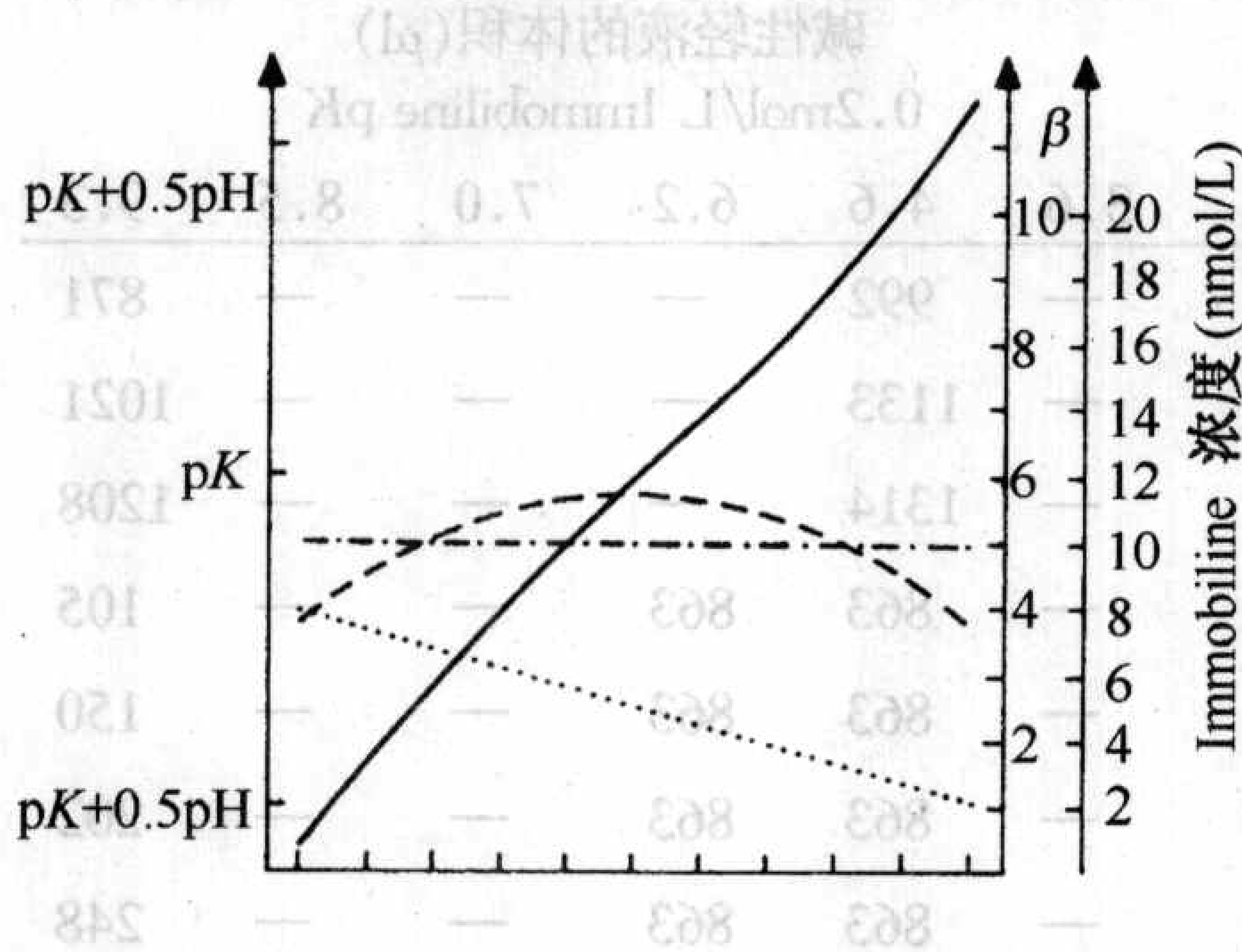


图 7.7　$pH_{mid}=pK$ 滴定方式的 pH 梯度[14]

—— pH 梯度　- - - - 缓冲能力

– · – · – C_B 缓冲 Immobiline 浓度

······ C_A 非缓冲 Immobiline 浓度

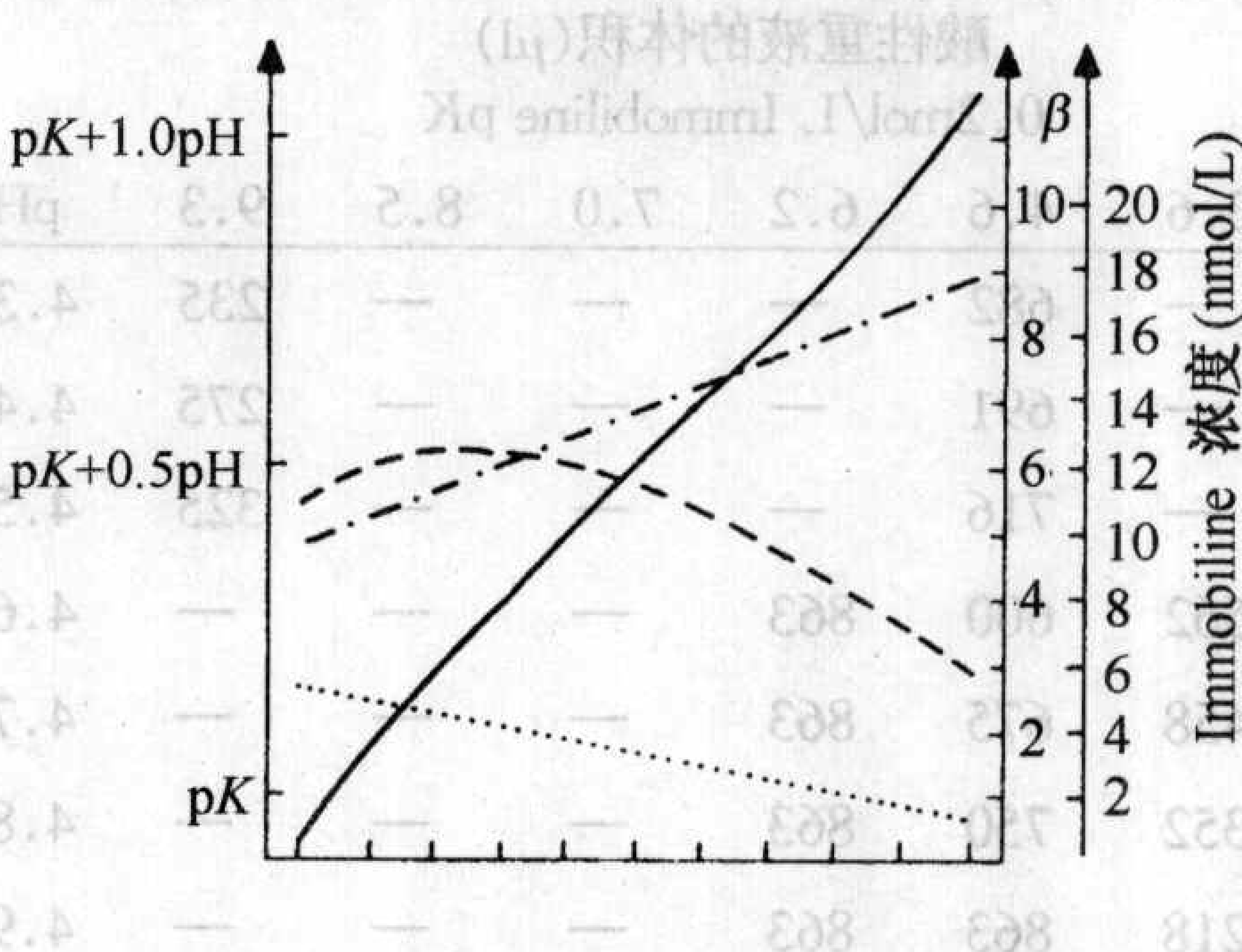


图 7.8　$pH_{mid}=pK+0.5$ 滴定方式的 pH 梯度[14]

—— pH 梯度　- - - - 缓冲能力

– · – · – C_B 缓冲 Immobiline 浓度

······ C_A 非缓冲 Immobiline 浓度

采用 $pH_{mid}=pK$ 的滴定方式建立 1 个 pH 范围的梯度受商品 Immobiline pK 种类的限制。如欲建立任何 1 个 pH 范围的固相 pH 梯度，可采用 $pH_{中点}\neq pK$ 的方式，如图 7.8。此时，$pH_{mid}=pK+0.5$pH 单位，也能得到几乎是线性的 pH 梯度（图中实线）。

根据上述“串联”（tandem）原理建立 1 个 pH 范围的梯度时，选择作为缓冲组分的 Immobiline 的 $pH_{mid}-pK$ 的绝对值最好趋于零，至少不超过 0.7。作为滴定剂的非缓冲 Immobiline 的 pK 值应尽可能远离 pH 范围的两端。理想的滴定剂的 pK 值应至少比 pH_{min} 或 pH_{max} 远 3 个 pH 单位。这样的滴定剂将仅仅提供一个酸、碱平衡以滴定缓冲基团。作者实验室[15]用“串联”原理得到 pH4.4～5.4 固相 pH 梯度用于 Gc 蛋白亚型的分离。

用于 1 个 pH 范围的固相 pH 梯度的配方见表 7.4[16]。

表 7.4　用于 1 个 pH 范围的固相 pH 梯度的配方[16]

酸性重液的体积(μl) 0.2mol/L Immobiline pK							碱性轻液的体积(μl) 0.2mol/L Immobiline pK					
3.6	4.6	6.2	7.0	8.5	9.3	pH 范围	3.6	4.6	6.2	7.0	8.5	9.3
—	904	—	—	—	129	3.8～4.8	—	686	—	—	—	477
—	817	—	—	—	141	3.9～4.9	—	707	—	—	—	525
—	755	—	—	—	157	4.0～5.0	—	745	—	—	—	584
—	713	—	—	—	177	4.1～5.1	—	803	—	—	—	659
—	689	—	—	—	203	4.2～5.2	—	884	—	—	—	753

酸性重液的体积(μl) 0.2mol/L Immobiline pK						pH范围	碱性轻液的体积(μl) 0.2mol/L Immobiline pK					
3.6	4.6	6.2	7.0	8.5	9.3		3.6	4.6	6.2	7.0	8.5	9.3
—	682	—	—	—	235	4.3~5.3	—	992	—	—	—	871
—	691	—	—	—	275	4.4~5.4	—	1133	—	—	—	1021
—	716	—	—	—	325	4.5~5.5	—	1314	—	—	—	1208
562	600	863	—	—	—	4.6~5.6	—	863	863	—	—	105
458	675	863	—	—	—	4.7~5.7	—	863	863	—	—	150
352	750	863	—	—	—	4.8~5.8	—	863	863	—	—	202
218	863	863	—	—	—	4.9~5.9	—	863	863	—	—	248
158	863	863	—	—	—	5.0~6.0	—	863	803	—	—	338
113	863	863	—	—	—	5.1~6.1	—	863	713	—	—	443
1251	—	1355	—	—	—	5.2~6.2	337	—	724	—	—	—
1055	—	1165	—	—	—	5.3~6.3	284	—	694	—	—	—
899	—	1017	—	—	—	5.4~6.4	242	—	682	—	—	—
775	—	903	—	—	—	5.5~6.5	209	—	686	—	—	—
676	—	817	—	—	—	5.6~6.6	182	—	707	—	—	—
598	—	755	—	—	—	5.7~6.7	161	—	745	—	—	—
536	—	713	—	—	—	5.8~6.8	144	—	803	—	—	—
486	—	689	—	—	—	5.9~6.9	131	—	884	—	—	—
447	—	682	—	—	—	6.0~7.0	120	—	992	—	—	—
416	—	691	—	—	—	6.1~7.1	112	—	1133	—	—	—
972	—	—	1086	—	—	6.2~7.2	262	—	—	686	—	—
833	—	—	956	—	—	6.3~7.3	224	—	—	682	—	—
722	—	—	857	—	—	6.4~7.4	195	—	—	694	—	—
635	—	—	783	—	—	6.5~7.5	171	—	—	724	—	—
565	—	—	732	—	—	6.6~7.6	152	—	—	771	—	—
509	—	—	699	—	—	6.7~7.7	137	—	—	840	—	—
465	—	—	683	—	—	6.8~7.8	125	—	—	934	—	—
430	—	—	684	—	—	6.9~7.9	116	—	—	1058	—	—
403	—	—	701	—	—	7.0~8.0	108	—	—	1217	—	—
381	—	—	736	—	—	7.1~8.1	103	—	—	1422	—	—
1028	—	—	750	750	—	7.2~8.2	548	—	—	750	750	—
983	—	—	750	750	—	7.3~8.3	503	—	—	750	750	—
938	—	—	750	750	—	7.4~8.4	458	—	—	750	750	—
1230	—	—	—	1334	—	7.5~8.5	331	—	—	—	720	—
1037	—	—	—	1149	—	7.6~8.6	279	—	—	—	692	—
885	—	—	—	1004	—	7.7~8.7	238	—	—	—	682	—

续表

酸性重液的体积(μl) 0.2mol/L Immobiline pK						pH范围	碱性轻液的体积(μl) 0.2mol/L Immobiline pK					
3.6	4.6	6.2	7.0	8.5	9.3		3.6	4.6	6.2	7.0	8.5	9.3
764	—	—	—	893	—	7.8~8.8	206	—	—	—	687	—
667	—	—	—	810	—	7.9~8.9	180	—	—	—	710	—
591	—	—	—	750	—	8.0~9.0	159	—	—	—	750	—
530	—	—	—	710	—	8.1~9.1	143	—	—	—	810	—
482	—	—	—	687	—	8.2~9.2	130	—	—	—	893	—
443	—	—	—	682	—	8.3~9.3	119	—	—	—	1004	—
413	—	—	—	692	—	8.4~9.4	111	—	—	—	1149	—
389	—	—	—	720	—	8.5~9.5	105	—	—	—	1334	—
1208	—	—	—	—	1314	8.6~9.6	325	—	—	—	—	716
1021	—	—	—	—	1133	8.7~9.7	275	—	—	—	—	691
871	—	—	—	—	992	8.8~9.8	235	—	—	—	—	682
753	—	—	—	—	884	8.9~9.9	203	—	—	—	—	689
659	—	—	—	—	803	9.0~10.0	177	—	—	—	—	713
584	—	—	—	—	745	9.1~10.1	157	—	—	—	—	755
525	—	—	—	—	707	9.2~10.2	141	—	—	—	—	817
478	—	—	—	—	686	9.3~10.3	129	—	—	—	—	903
440	—	—	—	—	682	9.4~10.4	119	—	—	—	—	1017
410	—	—	—	—	694	9.5~10.5	111	—	—	—	—	1165

7.1.3.3 窄范围和宽范围的 pH 梯度

根据“串联”原理，使用“内插法”可以得到小于1个pH范围的固相pH梯度的配方。如图7.9所示[17]，为了得到0.4pH单位（pH7.1~7.5）的固相pH梯度，可以使用pH6.8~7.8的配方，在pH7.1和pH7.5画出吊垂线，它们与p*K*3.6和p*K*7.0 Immobiline交点处便是pH7.1~7.5固相pH梯度所需的酸性和碱性Immobiline的体积。作者[18]用pH4.90~5.90的配方，同样用“内插法”得到了pH5.05~5.60范围的固相pH梯度，用于转铁蛋白的分析，见图7.10。使用“内插法”甚至可以得到0.1pH单位的固相pH梯度。

宽范围固相pH梯度的应用主要将其作为双向电泳的第一向。有三种方式可以产生[17]：①使用多腔梯度混合器；②用双腔梯度混合器混合相同摩尔浓度的缓冲Immobiline和不同摩尔浓度的滴定Immobiline；③用双腔梯度混合器混合不同体积，但相同的Immobiline。宽范围固相pH梯度（包括线性和非线性梯度）的配方见表7.5[16]。

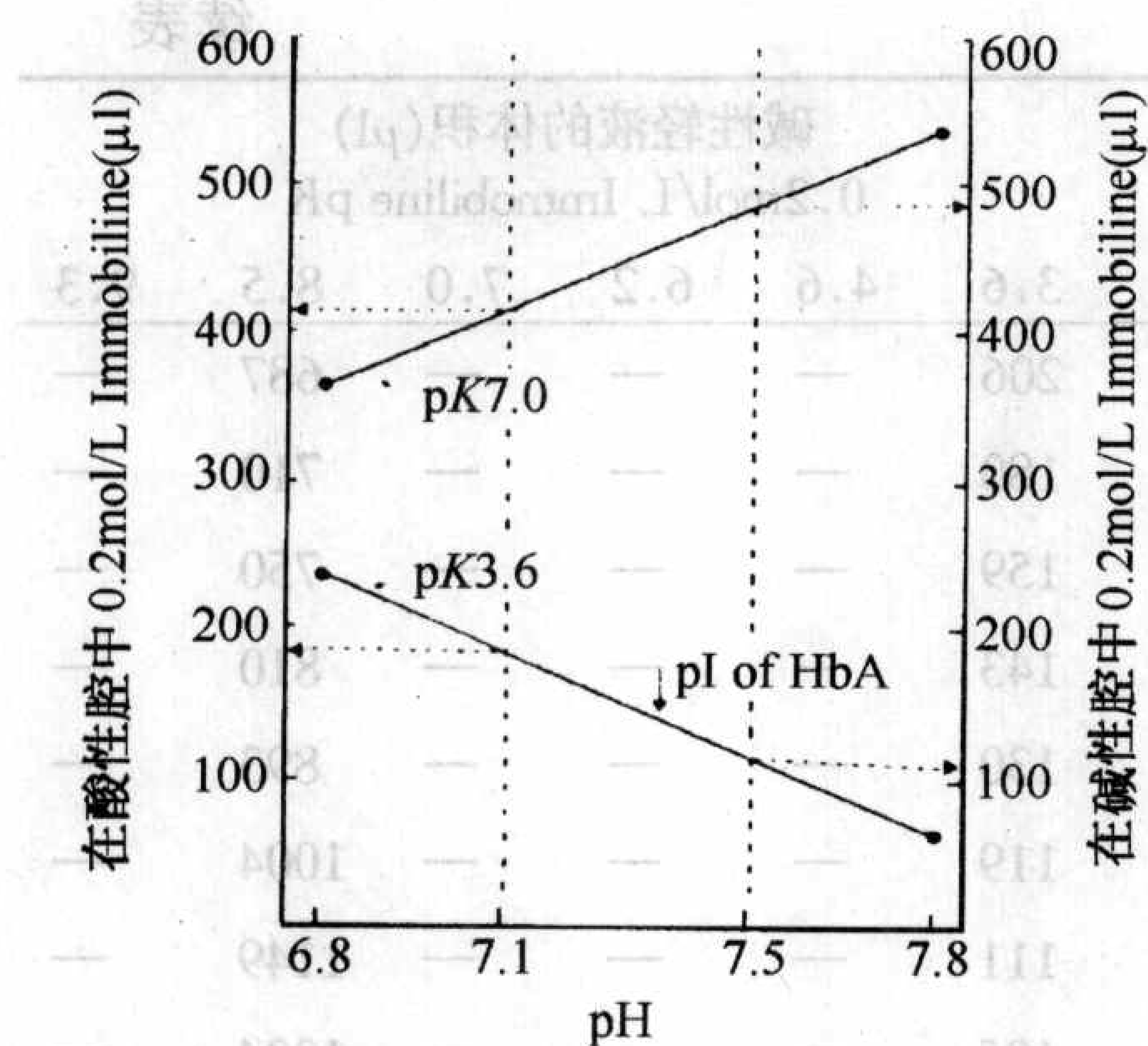


图7.9　根据“串联”原理，用“内插法”得到 pH7.1～7.5 固相 pH 梯度的酸性和碱性 Immobiline 的体积[14]

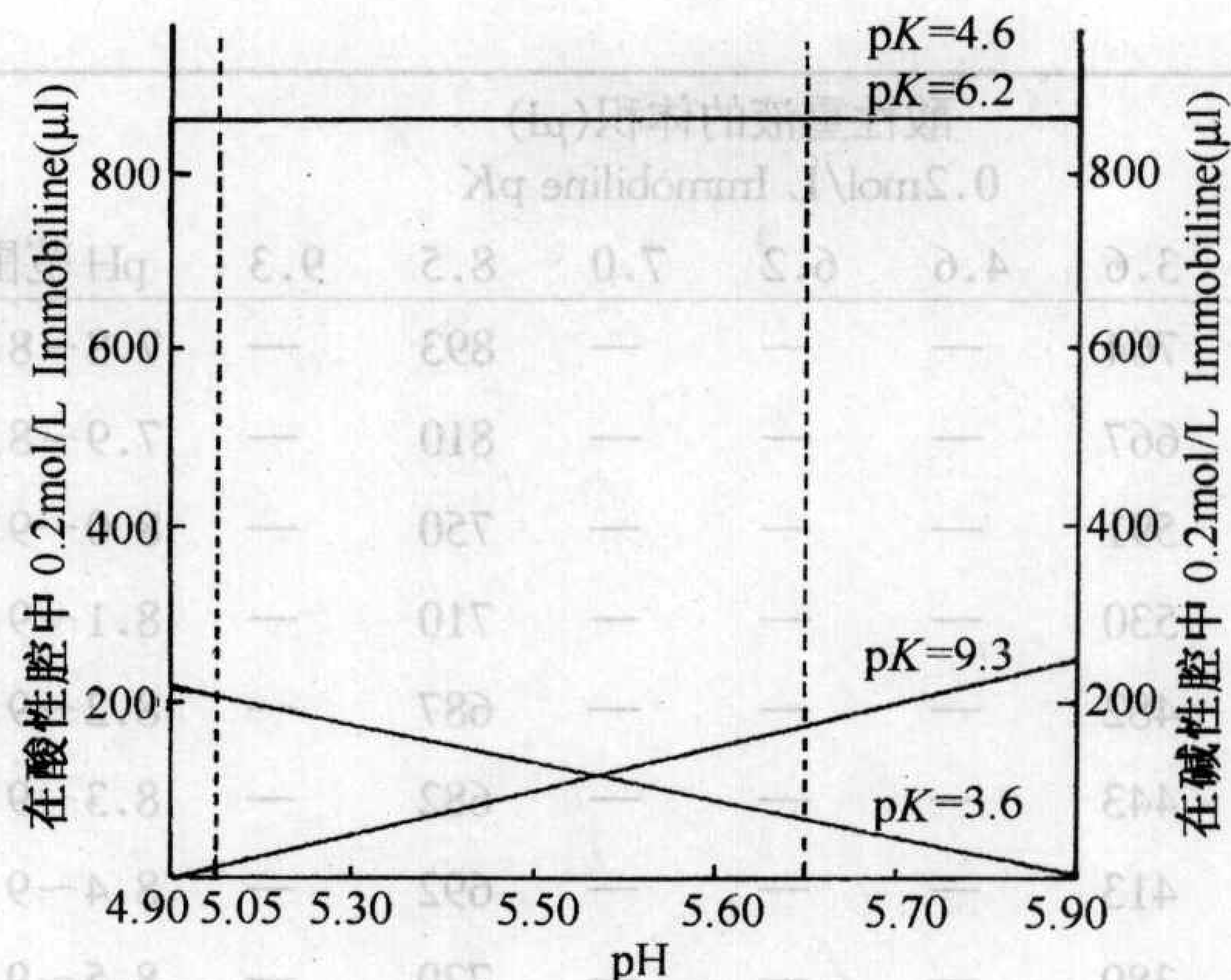


图7.10　根据“串联”原理，用“内插法”得到 pH5.05～5.6 固相 pH 梯度的酸性和碱性 Immobiline 的体积[18]

表7.5　宽范围固相 pH 梯度的配方[16]

酸性溶液体积(μl) 0.2mol/L Immobiline pK							碱性溶液体积(μl) 0.2mol/L Immobiline pK					
3.6	4.6	6.2	7.0	8.5	9.3	pH 范围	3.6	4.6	6.2	7.0	8.5	9.3
299	223	157	—	—	—	3.5～5.0	212	310	465	—	—	—
569	99	439	—	—	—	4.0～6.0	390	521	276	—	—	722
415	240	499	—	—	—	4.5～6.5	—	570	244	235	—	297
69	428	414	—	—	—	5.0～7.0	—	474	270	219	—	320
—	450	354	113	—	—	5.5～7.5	347	—	236	287	284	—
435	—	323	208	44	—	6.0～8.0	286	—	174	325	329	—
771	—	276	185	538	—	6.5～8.5	192	—	153	278	362	—
1349	—	—	272	372	845	7.0～9.0	484	—	—	232	189	546
668	—	—	445	226	348	7.5～9.5	207	—	—	925	139	346
399	—	—	364	355	94	8.0～10.0	91	—	—	329	366	289
578	110	450	—	—	—	4.0～7.0	302	738	151	269	—	876
702	254	416	133	346	—	5.0～8.0	175	123	131	345	346	—
779	—	402	93	364	90	6.0～9.0	241	—	161	449	237	225
542	—	—	378	351	—	7.0～10.0	90	—	—	324	350	280
588	254	235	117	170	—	4.0～8.0	—	554	360	142	334	288
830	582	218	138	795	122	5.0～9.0	—	249	263	212	292	230
941	—	273	243	260	282	6.0～10.0	100	—	333	361	239	326
829	235	232	22	250	221	4.0～9.0	147	424	360	296	71	663
563	463	298	273	227	127	5.0～10.0	21	59	34	420	310	273
1102	—	455	89	334	—	4.0～10.0	—	114	50	488	157	357
						非线性 pH 梯度						
692	325	671	—	—	—	4.0～10.0	43	—	195	238	87	138

固相 pH 梯度等电聚焦的原理是基于凝胶中的固相 pH 梯度。这些具有弱酸

或弱碱性质的丙烯酰胺衍生物共价结合到聚丙烯酰胺凝胶介质中形成 pH 梯度后[图 7.11 (1)]，带电的蛋白质分子便开始向自己的等电点位置迁移 [图 7.11 (2)]，直到到达等电点位置才停止 [图 7.11 (3)]。

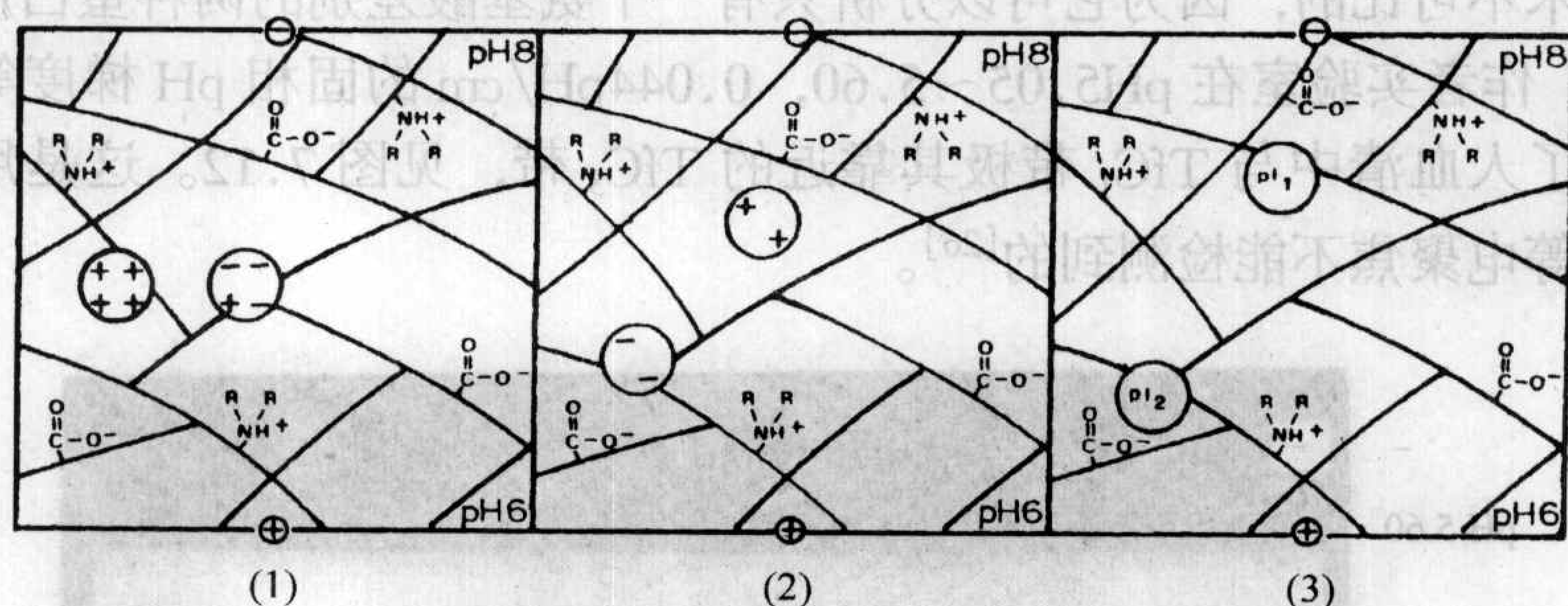


图 7.11 固相 pH 梯度等电聚焦原理[19]

(1) 加样；(2) 蛋白质分子开始迁移；(3) 蛋白质分子到达等电点位置

7.1.3.4 固相 pH 梯度的计算机模拟

固相 pH 梯度的计算机程序首先由 Celentano 等[20]设计，现已成为商业软件[21]，它可以从 10 种不同 pK 的 Immobiline 中选择缓冲离子和滴定剂（非缓冲离子)，计算 pH2.5～12 范围内的任意宽窄 pH 梯度，甚至可以进入“禁区”[22]。这不但扩大了 pH 梯度的计算范围，而且提高了准确度，使操作大大简化。

7.1.4 分 辨 率

固相 pH 梯度等电聚焦是目前一向电泳中分辨率最高的电泳技术，可以达到 0.001pH[2,14,23]，比常规载体两性电解质等电聚焦的分辨率 0.01pH[24] 要高一个数量级。如 6.1.3 节所述，根据 Rilbe 在 1973 年提出的关于分辨率的公式[25]：

$$\Delta \mathrm{pI} = 3\sqrt{\frac{[D\mathrm{d(pH)}/\mathrm{d}x]}{[E(-\mathrm{d}u)/\mathrm{d(pH)}]}}$$

这里 D（蛋白质的扩散系数）和 du/dpH（蛋白质的迁移率的斜率）是常数，并且分别与质量和电荷成正比。为了提高分辨率，只能增加电场强度 E 和使用窄范围 pH 梯度[d(pH)/dx]，固相 pH 梯度等电聚焦正是具备了这两个条件。

(1) *使用窄范围 pH 梯度* 如 7.1.3 节中所述，利用不同 pK 的 Immobiline，用内插法可查得 0.1pH 间隔的固相 pH 梯度，这样便可灌制 0.01pH/cm，甚至更窄 pH 范围的凝胶。

(2) *增加电场强度* 由于固相 pH 梯度使用的 Immobiline 浓度很低，使它比载体两性电解质凝胶的导电性差不多低 100 倍，而且共价结合到凝胶中的 pH 梯度不会受长时间聚焦时间的影响，这为高电压的使用创造了条件。

结合以上因素，虽然在靠近等电点时，蛋白质的迁移率很小，但有足够的电压和时间允许它们在极窄的 pH 范围内迁移到等电点位置。所以它的分辨率可达到 0.001pH。有几个例子可以说明固相 pH 梯度等电聚焦技术的分辨率是当前其它电泳技术不可比的，因为它可以分析只有一个氨基酸差别的两种蛋白质。

例 1：作者实验室在 pH5.05～5.60，0.044pH/cm 的固相 pH 梯度等电聚焦中，检测了人血清中与 TfC_1 带极其靠近的 TfC_3 带，见图 7.12。这是用载体两性电解质等电聚焦不能检测到的[26]。

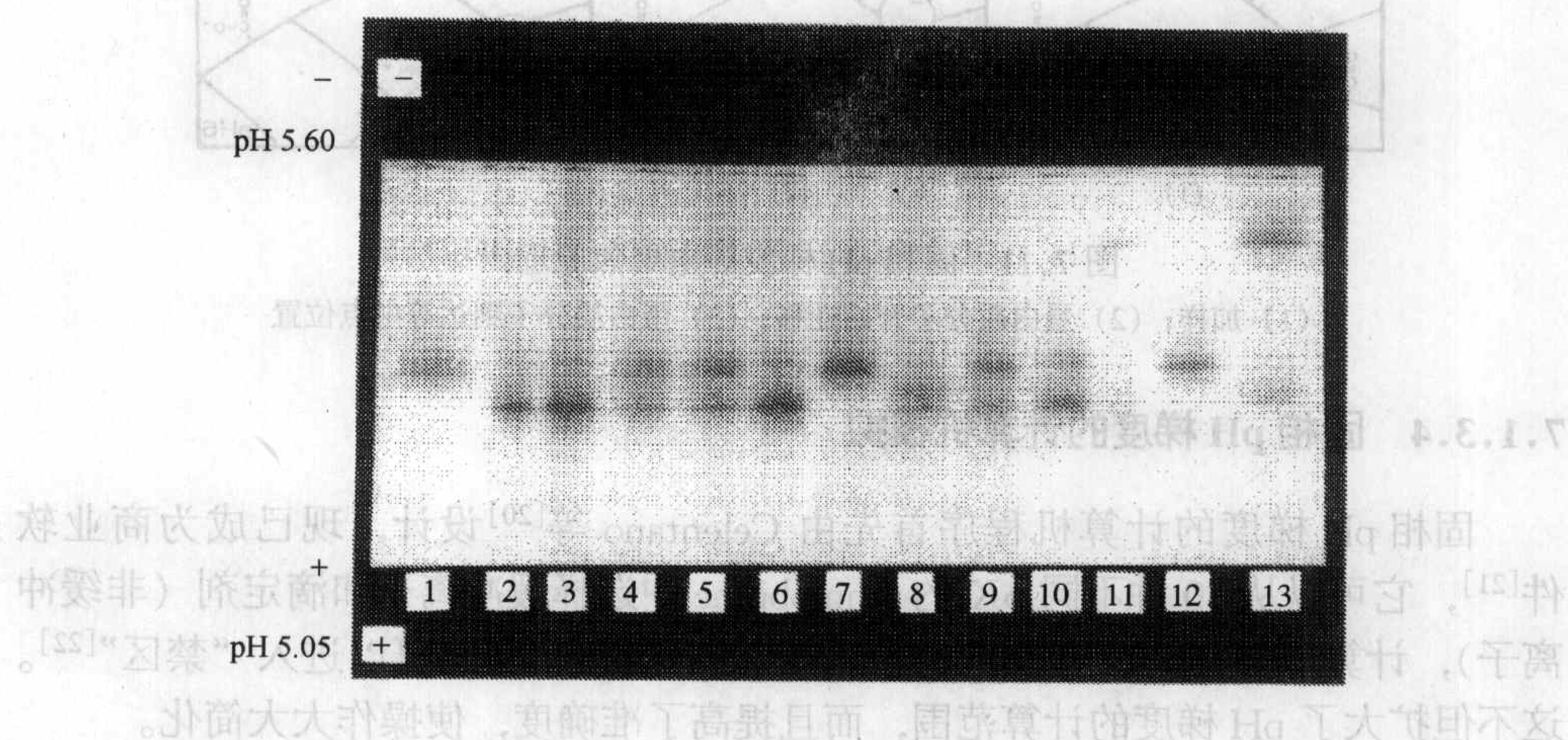


图 7.12　人血清转铁蛋白的固相 pH 梯度等电聚焦（pH5.05～5.6，0.044pH/cm）

1、7、12：TfC_2；2、3、6：TfC_1；4、5、9、10：TfC_1C_2；8：TfC_1C_3；11、13：TfC_1Dchi.

例 2：图 7.13 为卵清蛋白在不同 pH 范围的凝胶中的分辨率[2]。图中 A 为卵清蛋白在载体两性电解质等电聚焦 pH4～6（0.2pH/cm）中的谱带。此时虽然

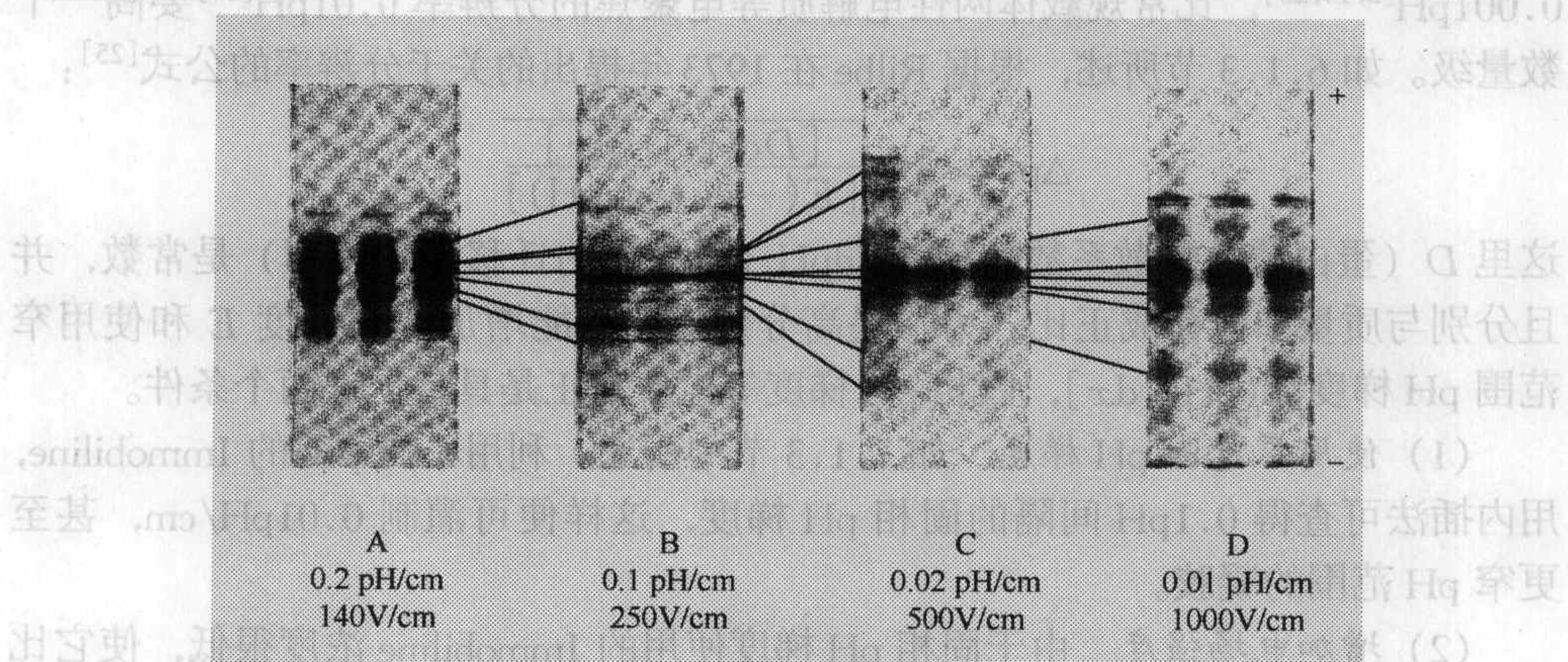


图 7.13　卵清蛋白在不同 pH 范围的凝胶中的分辨率[2]

分辨出一些带，但主带只能看到是单一的组分。但当卵清蛋白在固相 pH 梯度 0.02pH/cm 间隔中聚焦时，主带明显地被分成两个组分。这两个带的 pI 差为 0.002pH，此时相应的电荷差别只有 2/100 的单位质子电荷（可能表示一个氨基酸被另一个氨基酸代替）。这就比载体两性电解质等电聚焦的分辨率[25]高出 10 倍。如果与 60 年代初期的凝胶电泳只能分辨 1 个单位质子电荷[27]相比，固相 pH 梯度等电聚焦的分辨率要比它高 100 倍。

例 3：重组药物水蛭素（hirudin，HM_2）[22]等电点应为 pI 4.03，但在分离纯化后，仍然有 pI 4.31（a 带），pI 4.25（b 带），pI 4.10（c 带）和 pI 3.98（e 带）几种等电点极为相近的蛋白存在，见图 7.14。特别是 e 带（pI 3.98）与目标蛋白 d 带（pI 4.03）等电点只相差 0.05。在 pH 3.6～4.5 的固相 pH 梯度凝胶中无法将它们分开（见图 7.14 右图），只在 pH3.5～4.3 的凝胶中才得以将它们分开。e 带蛋白的 N 端比目标蛋白只少二个氨基酸（丝氨酸和缬氨酸）。

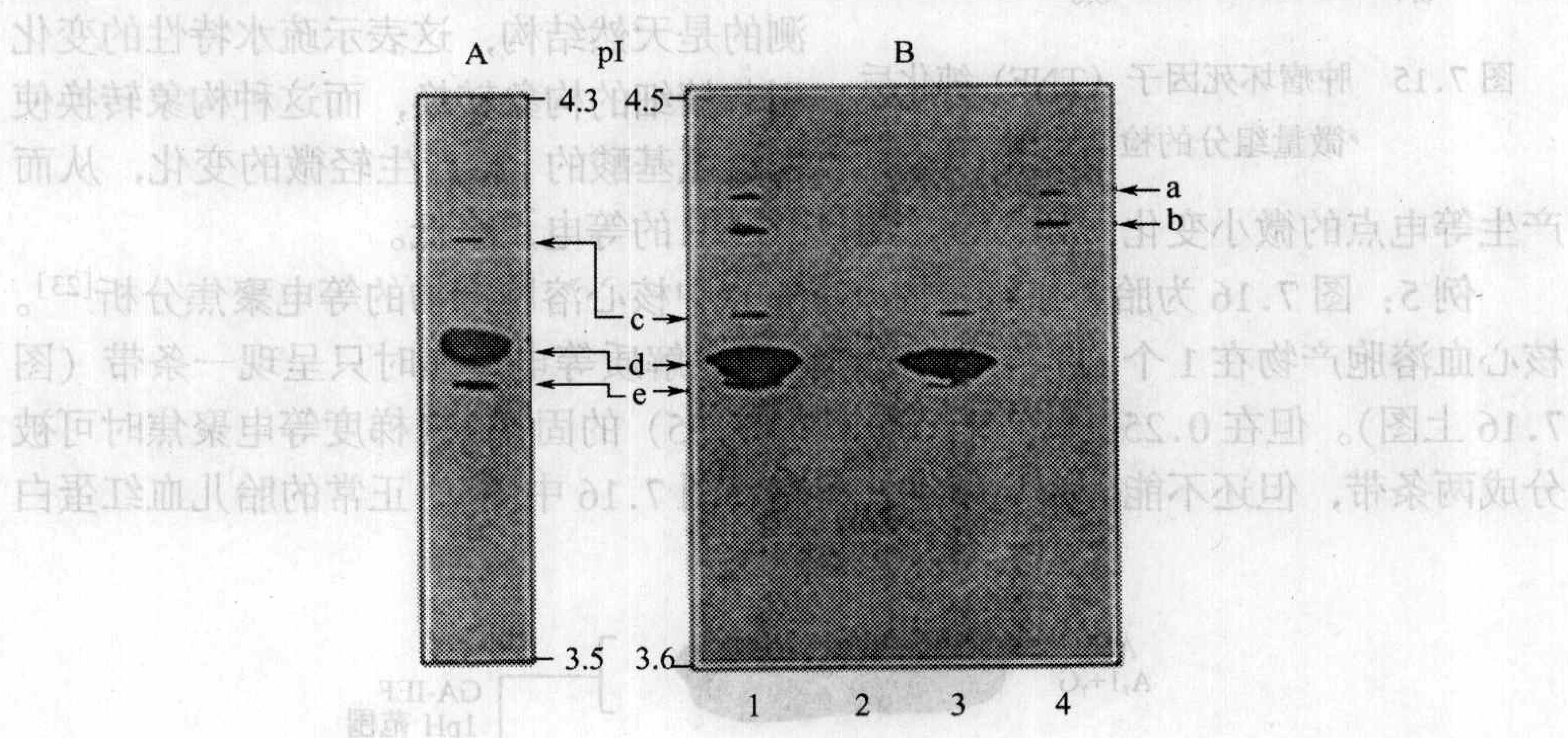


图 7.14　水蛭素纯化后微量组分的检测

a：pI 4.31　b：pI 4.25　c：pI 4.10　d：pI 4.03　e：pI 3.98

由于固相 pH 梯度的高分辨率，它不仅是表面电荷修饰的理想探针，可观察到宏观的变化如糖基化作用[28]、磷酸化作用[29]、乙酰化作用[30]、氨基甲酰化作用[31]，而且还可以探测精细的变化，如硫赶-二硫化物氧化还原型[32]、酰胺键合的乙醇胺磷酸甘油型[33]、甲基化[34,35]ADP-核糖基化作用[36,37]、泛醌化作用[38,39]和辅酶与蛋白的共价结合[40]等。

例 4：图 7.15 为基因工程药物—肿瘤坏死因子（tumor necrosis factor，TNF）在经过表达并纯化后微量组分的检测[22]。在大肠杆菌（*Escherichia coli*）上表达的 TNF 经过纯化分离后，约有 10％在 N 端含有附加的（extra）甲硫氨酸（即有两个甲硫氨酸）。但这用 N 端分析是无法检测的，因为它们和目标 TNF

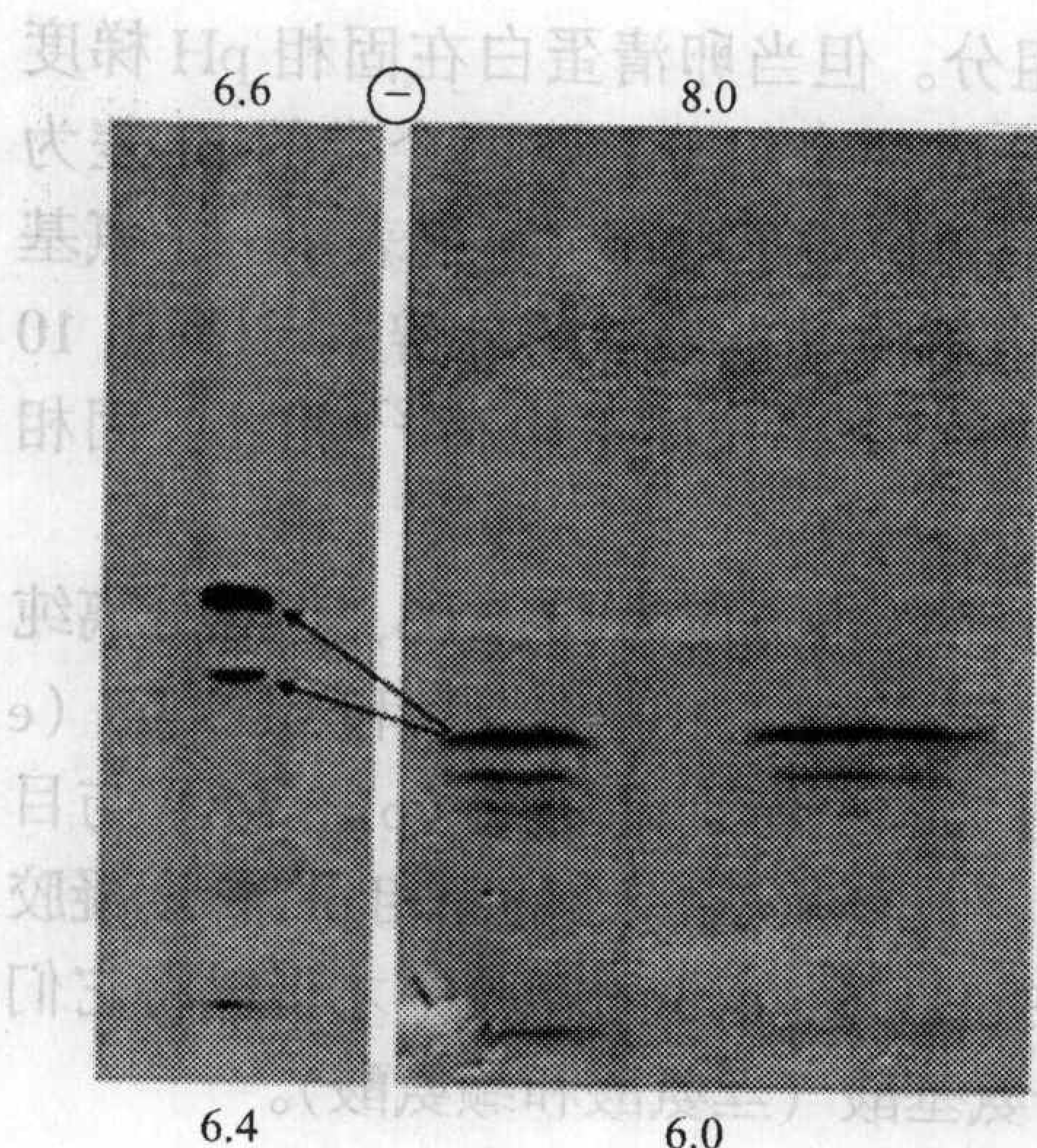


图 7.15　肿瘤坏死因子（TNF）纯化后微量组分的检测[22]

（一个甲硫氨酸）有相同的 N 端。如用 pH6～8 的等电聚焦也是无法检测到的（图 7.15 右图），因为分辨率不够，只有在0.2pH 范围（pH6.4～6.6）的固相 pH 梯度等电聚焦时，较低 pI 的组分（Met-TNF，即在 N 端有附加甲硫氨酸的，它只比 TNF 低 0.004pH）才能被分离（7.15 左图）。通过微序列和质谱分析，可以确认附加的甲硫氨酸的存在。由此可注意到固相 pH 梯度等电聚焦不仅能探测蛋白质表面电荷的变化，而且可观察到突变引起的蛋白疏水性的精细变化。因为探测的是天然结构，这表示疏水特性的变化引起精细的构象转换，而这种构象转换使邻近氨基酸的 pK 产生轻微的变化，从而产生等电点的微小变化，如 Met-TNF 比 TNF 的等电点略低。

例 5：图 7.16 为胎儿血红蛋白（HbF）中核心溶胞产物的等电聚焦分析[23]。核心血溶胞产物在 1 个 pH 范围的载体两性电解质等电聚焦时只呈现一条带（图 7.16 上图）。但在 0.25pH 范围（pH7.3～7.55）的固相 pH 梯度等电聚焦时可被分成两条带，但还不能分辨更精细的突变（图 7.16 中图）。正常的胎儿血红蛋白

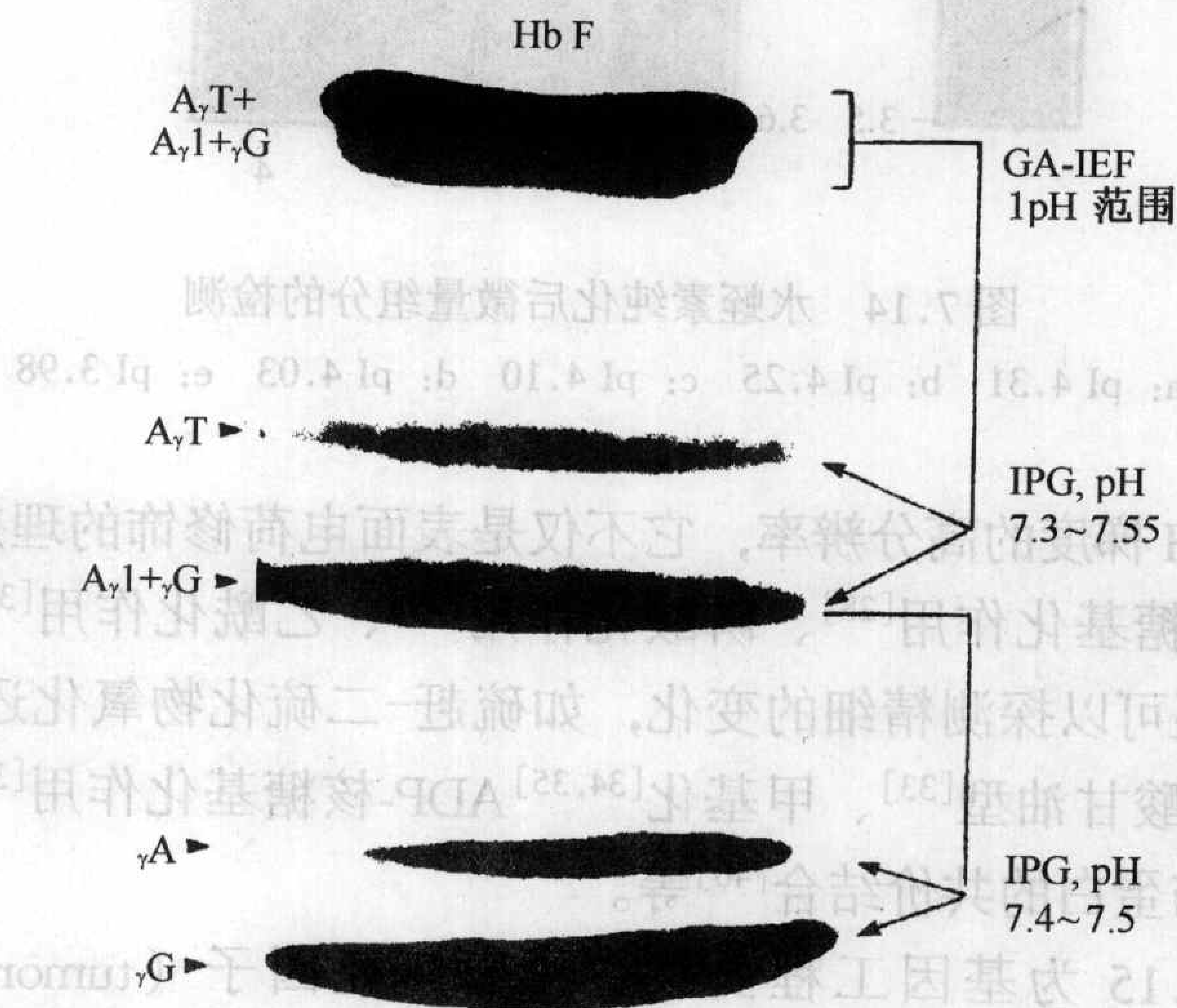


图 7.16　胎儿血红蛋白（HbF）中核心溶胞产物的等电聚焦[23]

(HbF) 是由两种组分组成的，称为 Aγ 和 Gγ。在 136 位置通常分别是 Ala 和 Gly 残基。这两个四体在胎儿期间的比例是 20∶80。如果将 pH 梯度进一步变窄到 0.1pH/10cm（pH7.4～7.5），这两个四体才能被分开（图 7.16 下图）。此时分辨率为 0.001pH，虽然在 γ 多肽链上只有一个甲基基团的区别，也能被聚焦为二条带。疏水突变体 Aγ 比 Gγ 的等电点稍高。

7.2 方　　法

固相 pH 梯度等电聚焦需要较高的电压，故一般均采用水平电泳。聚焦过程同样需要制胶、电泳和检测三个步骤。

7.2.1 制　胶[15, 16, 18, 41, 42]

如 7.1 节原理所述，固相 pH 梯度凝胶是由固相 pH 梯度介质（丙烯酰胺衍生物）共价结合到聚丙烯酰胺凝胶中并形成 pH 梯度，所以制胶过程比载体两性电解质凝胶复杂。灌胶的方法与常规聚丙烯酰胺梯度凝胶和 SDS 梯度凝胶相似。高质量的凝胶介质和固相 pH 梯度介质，聚合过程以及漂洗对固相 pH 梯度凝胶是非常重要的。

7.2.1.1　选择 pH 范围，计算缓冲与滴定 Immobiline 的体积

对未知样品 pH 范围的选择，最好先用宽范围（如 pH3.5～10）载体两性电解质等电聚焦确定其等电点的位置，再选择窄范围的固相 pH 梯度等电聚焦。确定范围后，根据表 7.4 和 7.5 查得或进一步用内插法计算得到缓冲和滴定 Immobiline 的体积。

7.2.1.2　贮液配置

丙烯酰胺单体贮液：溶解 14.55g 丙烯酰胺和 0.45g *N*，*N*′-甲叉双丙烯酰胺在 35ml 双蒸水中，搅拌直至溶解，用双蒸水加至 50ml。过滤，溶液可在 4℃保存两周。

40%（*W*/*V*）过硫酸铵贮液：溶解 0.4g 过硫酸铵在 1ml 双蒸水中。溶液必须新鲜配置。

Immobiline Ⅱ：使用前将贮存在 4～8℃冰箱中的 Immobiline Ⅱ溶液在室温平衡约 0.5 小时。

7.2.1.3　模具组装和凝胶溶液的配置

如 4.2.1.2 节和图 4.11 组装灌胶模具，但不需要在模具上做加样孔。如欲

灌注 $T=5\%$、$C=3\%$的凝胶，参见表 7.4，表 7.5 和表 7.6。凝胶溶液必须新鲜配置。一般将酸性 Immobiline 作为重液，碱性 Immobiline 作为轻液，俗称"酸重碱轻"。如欲提高电泳速度，可加 100μl 载体两性电解质。

表 7.6 固相 pH 梯度凝胶重液和轻液的配方[41]

贮 液	重液（混合腔）	碱液（贮液腔）
缓冲 Immobiline	? μl*	? μl*
滴定 Immobiline	? μl*	? μl*
丙烯酰胺单体贮液	1.25ml	1.25ml
甘油（87%）	2.1ml	—
双蒸水定容到	7.5ml	7.5ml

* 根据表 7.4 和 7.5 查得或用内插法计算。

7.2.1.4 灌胶

固相 pH 梯度的灌胶模具可使用与常规聚丙烯酰胺梯度凝胶和 SDS 梯度凝胶灌胶相同的模具，参见 4.2.1.2 节和图 4.11。但不需要做加样孔，并且不需要有浓缩胶和分离胶之别。作者实验室曾灌注 pH4.4～5.4 固相 pH 梯度胶用于分析 Gc 蛋白亚型[15,41]和 pH5.05～5.60 固相 pH 梯度凝胶用于分析转铁蛋白[18,26]。

1）灌胶前梯度混合器的腔间阀和流出管的夹子都应关闭。
2）将 7.5ml（视凝胶大小而定）轻液（碱性）注入梯度混合器的储液腔。小心打开腔间阀，赶去腔间气泡，再关上腔间阀。若不慎有轻液流入混合腔，则需将轻液吸回储液腔。
3）将同样体积的重液（酸性）注入梯度混合器的混合腔。在两个腔中分别放入同样大小的搅拌子，在储液腔中放入补偿棒，此时两腔液面应该相平。
4）将梯度混合器置于磁力搅拌器的最佳位置上。将流出管插入灌胶模具中央。为了控制流速，得到线性梯度，梯度混合器的出口与流出管末端高度相差约 5cm。开动磁力搅拌器（200～500r/min）。
5）在两个腔中各自先加 TEMED，再加过硫酸铵。打开流出管的夹子，当酸液流到流出管的一半时，打开腔间阀。两腔中液面同时下降，在混合腔混合后，缓缓注入垂直放置的模具中。
6）灌注完毕后，在室温静置 5～20 分钟（可用异丙醇封胶）。放入 30～40℃烘箱中聚合。灌胶后，立即洗净梯度混合器，以免堵塞腔间阀。

灌胶过程中应注意的问题参见 7.3.3 节。

7.2.1.5 洗胶和吹胶

凝胶聚合约需 1 小时，从烘箱中取出凝胶模具后，同 6.3.1.1 节方法取出凝胶，标上正、负极。称重后放入双蒸水中（6×10 分钟或 3×1 小时），室温下振

摇约60次/分钟，洗去催化剂和未聚合的单体。洗胶后，用软纸吸去表面的水。用冷风（小电扇）在一定距离约（50cm）吹胶至与洗胶前重量相差小于1%。如果凝胶中含有过多水，影响胶浓度和梯度，在电泳时易在凝胶表面形成水滴，改变导电性干扰聚焦。小于pH8的凝胶至多可保存一周，碱性胶不宜保存[42]。

7.2.2 等电聚焦

打开循环水浴，设置冷却温度，一般为10℃。

将制好的固相pH梯度凝胶铺在冷却板上，注意正负极。其间涂以液体石蜡或煤油，避免气泡陷入，以保证胶板和冷却板之间的良好接触。

用合适的电极溶液（参见表7.7）[42]润湿滤纸电极条，分别放置凝胶的酸、碱侧。有的仪器采用粗电极与凝胶直接接触，不需加电极条。

表7.7 电极溶液[42]

阳 极 液	阴 极 液
双蒸水①	双蒸水②
0.3%～1%载体两性电解质②	0.3%～1%载体两性电解质②
10mmol/L 谷氨酸	10mmol/L 赖氨酸

注：①适合宽pH范围凝胶和高盐浓度的样品。

②使用相同或窄于固相pH梯度pH范围的载体两性电解质。

按冷却板上的格子和预先设计的实验计划将样品加在凝胶上。微量样品可直接滴加，稀样品加在滤纸块上或小槽中。固相pH梯度等电聚焦与载体两性电解质等电聚焦的样品处理方法相似，只是前者pH梯度已在凝胶中固定，所以样品中的盐对梯度影响不大，但过高的盐浓度也会造成凝胶电导的降低而烧胶或使谱带畸变。

将白金电极丝分别放在滤纸电极条的中心，再将阳极和阴极分别与电源的正、负极相连。接通电源，电参数参见表7.8。

表7.8 电参数（温度放置在10℃）[15,18]

	电压（V）	电流（mA）	功率（W）	时间（小时）
第一相预聚焦	500	1	1	1～4
第二相聚焦	3500	5	10	12～16
第三相聚焦	3500	2	5	2

注：①如在制胶时用载体两性电解质作添加剂，可以大大缩短电泳时间，如在1个pH的梯度范围中，聚焦时间可减少到3～5小时。

②为了提高分辨率，在第二相聚焦后，可将阴、阳电极和电极条移至待分辨的谱带，如文献[18]所做的那样，但也可以只做第二相聚焦。

③预聚焦程序只适合于含低盐浓度的样品（<5～10mmol/L）。

7.2.3 pH 梯度的测定

由于固相 pH 梯度凝胶的导电性很低，不可能用表面电极测定凝胶表面的pH。但对于宽范围的固相 pH 梯度可以用等电点蛋白标准来测定，方法同载体两性电解质等电聚焦。但目前还没有合适的市售蛋白标准可用于测定窄范围的固相pH 梯度。灌制凝胶时，pH 梯度范围是已知的，且梯度是线性的。故可根据凝胶两端之间距离来测算 pH 梯度和蛋白质的 pI。在灌制非线性梯度胶时，则可根据非线性梯度来计算。

7.2.4 检 测

7.2.4.1 各种染色方法

在上述各章中所述的染色方法，包括各种考马斯亮蓝方法、银染色、荧光探针法、放射自显影、免疫固定等均适用于固相 pH 梯度等电聚焦后的检测。

作者实验室[18]进行转铁蛋白的考马斯亮蓝 R-250 染色时，脱色困难。用 G-250 染色时，脱色同样困难。为了提高脱色效率，改进了脱色液的配方，调整了染色和脱色时的温度和时间。

7.2.4.2 凝胶干燥与保存

请参阅 4.2.5。

7.2.4.3 扫描与定量

请参阅第 4.2.6 和 6.4.11.2。

7.2.4.4 双向电泳

请参阅第 8 章。

7.2.4.5 电泳转移

请参阅第 10 章。

7.3 实 验 考 虑

7.3.1 固相 pH 梯度的优缺点

优点：

(1) 分辨率高　根据等电聚焦的原理，在一定分离距离中，pH 梯度范围越小，分辨率越高。固相 pH 梯度可以在实验室被灌制成窄至 pH0.1 的范围，不像载体两性电解质 pH 梯度的范围受商品的限制，所以分辨率可以达到 0.001pH。

(2) pH 梯度稳定，不漂移，不随时间而变化　这是由于固相 pH 梯度不像载体两性电解质 pH 梯度，是由缓冲基团共价结合到凝胶介质中产生的。因此，在聚焦时，电场强度和聚焦时间都不受限制。实际上，这也有助于分辨率的提高。

(3) 选择性大　pH 梯度范围和斜率可以自由选择。

(4) 重复性好　包括 pH 梯度的重复性和分离结果的重复性。前者是由于梯度的产生是用几种不同 pK 的 Immobiline 滴定而成的，因而 pH 范围、斜率、离子强度、缓冲能力、导电性等都可以得到控制，不像载体两性电解质 pH 梯度是由许多小分子在电场中迁移而成的。后者是由于固相 pH 梯度是线性的，并且是稳定的，它不受盐、缓冲离子或样品的影响。

(5) 加样能力大　在固相 pH 梯度凝胶上可以加比较大量的样品。如在 10mm×0.5mm 的 1 个 pH 范围的凝胶条上可以加2500μg的肌球蛋白（但在大于 1000μg 时产生拖尾）[16]。在每毫升凝胶体积的凝胶上，聚焦带的蛋白浓度可以达到 40～50mg[43]。加样量通常可以是载体两性电解质等电聚焦的 10 倍。

(6) 样品中盐的干扰小　盐离子的影响对载体两性电解质等电聚焦是最伤脑筋的。但由于固相 pH 梯度的原理，盐的影响很小，所以后者分离的蛋白带常常很直。

(7) 碱性蛋白能在固相 pH 梯度等电聚焦中很好的分离　因为 pH 梯度不会产生阴极漂移，而且很稳定。

(8) 可直接用丹磺酰氯和茚三酮染色　因为在固相 pH 介质中没有第一、第二氨基，只有第三氨基作为缓冲基团，所以低分子质量的蛋白能直接用丹磺酰氯或茚三酮染色，而载体两性电解质也能被这些染料染色，所以如用这些染料染色时，凝胶背景较深。

(9) 适合于样品的制备　因为固相 pH 梯度等电聚焦加样量大，且容易从缓冲液中分离样品，故适合于制备用。

(10) 无边缘效应　由于固相 pH 梯度是凝胶的一部分，所以没有边缘效应，能用很窄的胶条（如 5mm 宽）进行聚焦。这个优点使它适合于作为双向电泳的

第一向。

缺点：

1）固相 pH 梯度凝胶灌胶技术比较复杂。常常由于容量误差而造成 pH 范围的偏差。如 2%的容量误差可以使 pH 与预期值偏差 0.1pH[16]。

2）固相 pH 梯度等电聚焦只能使用聚丙烯酰胺凝胶。

3）电泳时需要高电压，且电泳时间长。

4）窄 pH 梯度测定困难，只能用计算的方法。

5）一些蛋白在窄 pH 范围的固相 pH 梯度凝胶中迁移困难。

7.3.2 pH 范围的选择

由于固相 pH 梯度是利用具有弱酸和弱碱性质的丙烯酰胺衍生物滴定而成，所以可任意选择 pH 范围，又由于它的高分辨能力，故它适用于在窄和极窄 pH 范围内分析样品。对未知样品一般先用宽 pH 范围的载体两性电解质等电聚焦以大致确定欲分析蛋白的等电点位置（自制凝胶操作简便，且可以测定 pH 梯度）。再缩小 pH 范围，使用窄或极窄固相 pH 梯度范围直到达到分辨要求。但对成分复杂的样品，酸、碱性蛋白和作为双向电泳的第一向，宽 pH 范围的固相 pH 梯度等电聚焦更为合适。

7.3.3 灌胶与聚合

为了确保 pH 梯度的线性（或非线性），在查表或计算确定缓冲与非缓冲 Immobiline 的体积后，灌胶技术是非常重要的。固相 pH 梯度凝胶通常用垂直方法灌注。灌胶应注意以下问题：

(1) *稳定液相梯度* 在凝胶溶液中应加适量的惰性化学试剂，如甘油或蔗糖，以满足密度和黏度的需要。在加甘油或蔗糖后的重溶液与轻溶液（未加甘油或蔗糖）之间的密度差造成的凝胶体积的不同可在轻溶液中用补偿棒来补偿。凝胶溶液必须新鲜配置。

(2) *正确量取缓冲和滴定 Immobiline 的体积* 这是保证梯度 pH 范围和线性的最关键的因素。Immobiline 的用量是很小的（几十到几百微升）。Ek[43]的实验表明 2%的容量误差可导致0.1pH的偏差。Righetti[44]建议配制双倍的凝胶溶液以减小容量误差，但 Immobiline 十分昂贵。Righetti 还建议，当量取在 n-丙醇中的碱性 Immobiline 时，管头要在凝胶溶液中多洗几次，因为它们会吸附在管头上（溶解在水中的酸性 Immobiline 不会吸附在管头上），但这给操作带来麻烦。作者实验室曾比较用微量移液器（Gelson）、微量注射器（上海安亭微量进样器厂或上海医用激光仪器厂）和0.1ml 移液管（国产）取液对 pH 梯度的影响，结

结果观察到采用微量注射器时，重复性高，且配制的凝胶 pH 范围与设计的 pH 范围最接近。

(3) *梯度混合器的位置和搅拌速度* 梯度混合器的混合腔应位于磁力搅拌器的中心位置，储液腔位于边缘。一旦选定合适位置，做好标记，以保证实验的重复性。两腔中的搅拌子应有相同的大小和重量。

搅拌速度要适中。过快的速度会产生大旋涡，使两腔液面不平，产生气泡，影响聚合。过慢又会使腔中液体混合不匀，一般应选 200～500rpm/min，使搅拌子转动平滑，腔中产生小小的旋涡为宜。

(4) *灌胶速度* 灌胶速度是由梯度混合器的流出管的直径、长度以及流出管口和模具上端之间的高度差决定的。高度差约为 5cm。流出管的直径小、流速慢、易堵塞。直径大、流速快、破坏梯度线性。长度不宜过长，以满足梯度混合器流出管口与模具液体入口的距离为宜。两腔中各 7.5ml 溶液约需 4～5 分钟灌完。

(5) *稳定时间* 具有重力梯度差的储液进入模具以后需要一个平衡时间建立线性梯度，所以灌胶完毕后应在室温静止 10～20 分钟。然后放在 50℃ 烘箱中约需聚合 1 小时。

影响凝胶聚合的因素与载体两性电解质凝胶基本相同，请参阅 6.4.4 节。

pH 梯度的线性在染色、脱色后可以从蛋白带的位置和形状来判断。如果只是为了摸索实验条件，可在酸性凝胶液中加溴酚蓝，使在凝胶中形成蓝色梯度，再进行凝胶扫描，便可观察到线性程度。

7.3.4 洗胶与干胶

固相 pH 梯度凝胶的漂洗是非常必要的。漂洗后，可以将多余的过硫酸铵和未聚合的 Immobiline 以及丙烯酰胺单体洗掉。否则游离的酸和碱将在阳极和阴极附近形成很大的平衡区而妨害蛋白聚焦。再则固相 pH 梯度等电聚焦需要的电压高、时间长，这些游离的酸和碱将导致烧胶。

如欲长时间保存凝胶或在凝胶中加添加剂(如尿素、去污剂、载体两性电解质等) 最好先制成干胶，再泡胀时，在泡胀液中加入添加剂。

干胶的制作方法是将洗后的凝胶放在 2.5% (V/V) 甘油中 60 分钟，在玻璃板上晾干后存放在密封塑料袋中。在 -20℃ 可保存 1～2 月。

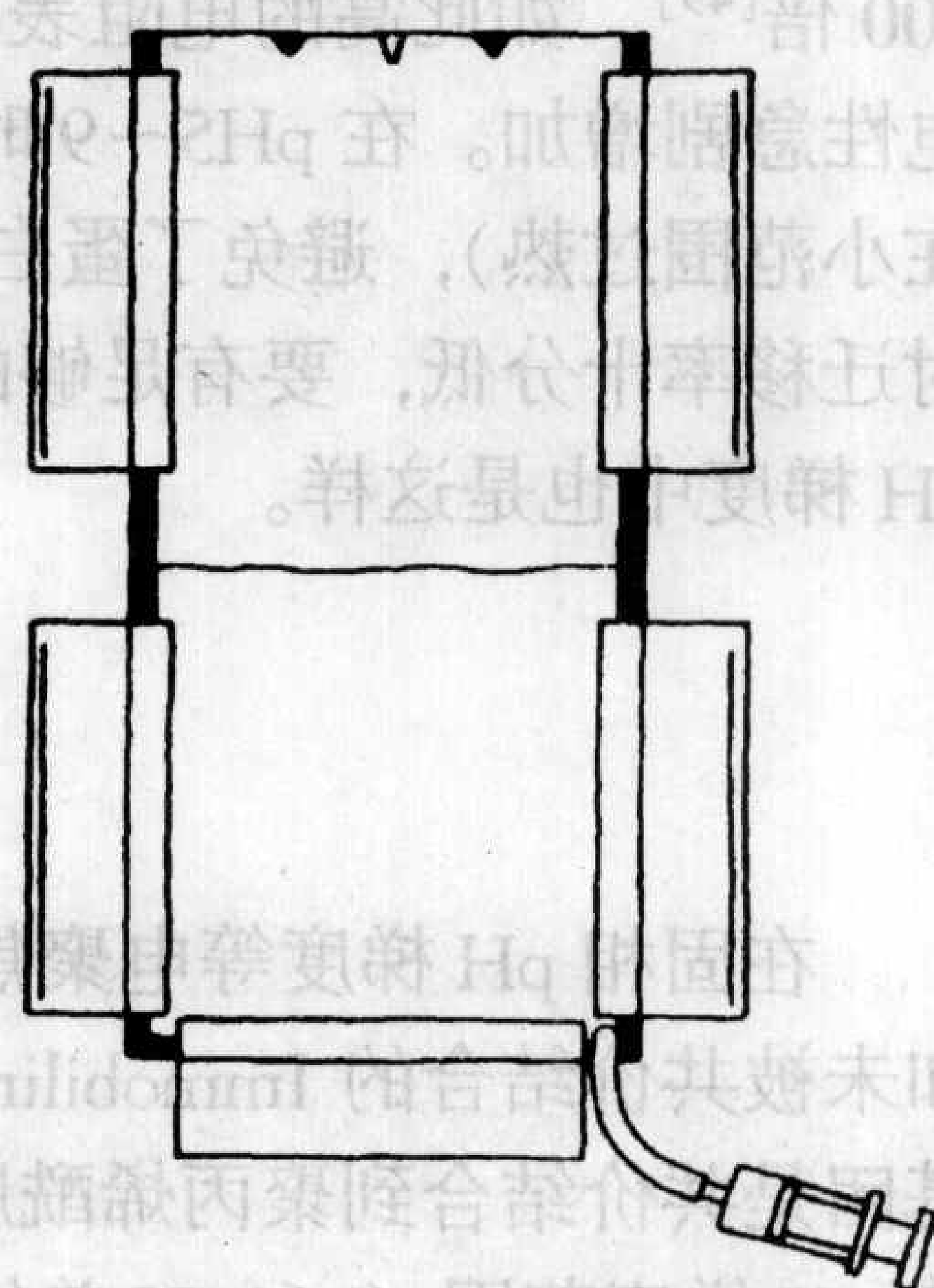


图 7.17 Immobiline 凝胶干胶泡胀[42]

使用前泡胀干胶的方法是先在平板玻璃上滴几滴水，将干胶放在玻璃上（胶面朝上），排除气

泡，再盖上有一定厚度的玻璃板（以保证泡胀后凝胶的厚度），用夹子夹紧，灌注欲泡胀的溶液，如图 7.17。如果用水泡胀约需 1～2 小时。如果用尿素或去污剂泡胀应过夜。

7.3.5 离子强度、缓冲能力和导电性

离子强度会影响蛋白质的 pK 值，也会影响 Immobiline 的 pK 值。但在固相 pH 梯度等电聚焦中，离子强度可以通过 Debye-Hückel 公式[45]计算得到。根据计算认为，在固相 pH 梯度等电聚焦中通常使用的 Immobiline 浓度，当其 pK 的变化小于0.03pH时，离子强度的影响可以忽略不计。但当 Immobiline 的浓度在 30mmol/L 时，便会影响 pH 梯度和改变谱带的位置[44]。

酸、碱 Immobiline 在混合物中的缓冲能力也是可以计算的。为了使 pH 梯度稳定，缓冲能力应尽可能的高而且均匀，这样凝胶中的不纯物（如丙烯酸）或小的干扰不会影响 pH 梯度[46,47]。根据现在的配方，分析固相 pH 梯度凝胶的缓冲能力一般为 3mequiv/L·pH，这足以产生稳定和具有很好分辨能力的梯度。高的缓冲能力能给出窄带，但这样的凝胶在染色和脱色过程中会严重肿胀（如两种 Immobiline 的总浓度超过 30mmol/L）[48]。

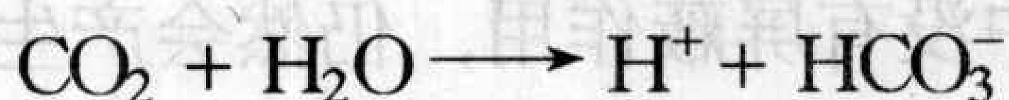
在 Immobiline 凝胶中最初的导电性取决于介质中自由的、非共价键离子，它们大部分虽然在洗胶时已被洗去，但是一些用于聚合作用的离子催化剂和一些未结合进去的 Immobiline 不能完全被洗去。当未结合的离子迁移时，导电性急剧下降。如果凝胶最初会有大量离子，这种离子的迁移可以用肉眼观察到一条折射线。有时还伴随水的迁移，结果在电极旁就像筑起一道屋脊[44]。当使用的 Immobiline 浓度较低时（如 10mmol/L），凝胶的导电性比载体两性电解质凝胶低 100 倍[49]。如此高的电阻表明是 H^+ 和 OH^- 的贡献。在 pH＜5，pH＞9 时，导电性急剧增加。在 pH5～9 时由于导电性很低，在凝胶上不会有“热点”（凝胶在小范围过热），避免了蛋白的热变性。这种梯度的稳定性使蛋白即使在靠近 pI 时迁移率十分低，要有足够的时间到达平衡位置（pI 位置）。而且即使在极窄的 pH 梯度中也是这样。

7.3.6 电 内 渗

在固相 pH 梯度等电聚焦时电内渗通常不是问题。因为没有被洗掉的催化剂和未被共价结合的 Immobiline 在电泳时电解后的净电荷为零。Immobiline 的缓冲基团是共价结合到聚丙烯酰胺介质中的，所以不会产生 pH 梯度的漂移。但是在窄 pH 梯度范围（≤1pH 单位），谱带会变宽。为了使谱带变窄，可用 20% 甘油代替双蒸水洗胶[16]。在超薄凝胶固相 pH 梯度等电聚焦时，在靠近电极的极端

的 pH 区域会形成一个槽，结果凝胶会变干，甚至被烧胶，但这样的现象不会发生在 pH4～10 之间，通常只在极端 pH。

二氧化碳引起电内渗的现象首先由 Delincée 和 Radola[50] 阐述。在 pH＞6.3 时，溶解在凝胶中的二氧化碳随 pH 而增加（pH6.3 是碳酸的第一个介离 pK 值）并形成 HCO_3^-：



$$CO_2 + H_2O \longrightarrow H^+ + HCO_3^-$$

在载体两性电解质等电聚焦中使 pH＞6.3 的梯度向阴极漂移。虽然在固相 pH 梯度等电聚焦中二氧化碳的作用机制与此不同，但是它改变了理论 pH 梯度的斜率。改变的程度取决于在那个位置 HCO_3^- 和 Immobiline 的缓冲能力的比（$\beta_{HCO_3^-}/\beta_{Immobiline}$）。$HCO_3^-$ 离子从阴极端迁向阳极产生 OH^- 和 CO_2：



$$HCO_3^- \longrightarrow OH^- + CO_2$$

在阳极侧释放的二氧化碳又在阴极侧被吸收。这两个过程在系统中循环发生。如果在系统中清除二氧化碳，谱带会明显变细变窄。为此系统最好在电泳时用惰性气体冲洗（比空气重的气体，如氩气，不能用氮气），或用以下几个方法：

1）将凝胶放在石蜡油（paraffin oil）中等电聚焦，这样即使 pI＞7 的带也可以被很好的聚焦[51]；

2）用浸有 1 mol/L NaOH 和 $Ca(OH)_2$ 的两条滤纸分别放在凝胶的外侧；

3）用疏水性塑料膜覆盖在凝胶上进行电泳。

7.3.7 蛋白质的可溶性和添加剂

在固相 pH 梯度等电聚焦时，样品的浓度，处理方法和加样位置等与载体两性电解质等电聚焦基本相同。但一些蛋白质可溶性很低，或在接近它们的等电点时可溶性很低，此时必须使用增加可溶性的添加剂，如载体两性电解质、尿素、去污剂等才能提高分离效果。

在进行膜蛋白的等电聚焦时，将载体两性电解质加在样品和凝胶中会增加膜蛋白的可溶性。这可能是由于它与蛋白直接形成复合物或是由于它与去污剂（用于溶解膜蛋白的）形成混合微团的原因，见图 7.18[52]。在不加载体两性电解质时，一些不溶解的膜蛋白分子不能进入凝胶，停留在加样区周围（特别在阴极加样）。4 种碱性 Immobiline 的疏水性比酸性 Immobiline 强，结合到凝胶中时，在亲水的聚丙烯酰胺凝胶表面形成疏水小区域。疏水反应的强度是直接与疏水区域的大小和它的表面压力的乘积成正比的。载体两性电解质分子的加入使分子接触减少。导致疏水小区减小并减弱了疏水反应。所以 Righetti[7] 把原来将载体两性电解质作为增溶性离子的想法扩展到把它假设作为屏蔽分子（shielding molecules）。一侧（特别是碱性侧）覆盖在结合 Immobiline 的聚丙烯酰胺凝胶介

质上，另一侧覆盖在蛋白本身。这就大大地淬灭了疏水蛋白和聚丙烯酰胺凝胶介质之间的相互反应，从而有效地将蛋白从多聚物周围的洞中“拽”出来聚焦成一条带。载体两性电解质的这种屏蔽作用必须发生在固相 pH 梯度凝胶和样品中都加的情况下。如果只在电泳的电极条中加载体两性电解质，屏蔽作用只能维持很短时间，是没有作用的。另外，这种屏蔽机制只在非聚焦状态时最有效，在预聚焦的载体两性电解质凝胶中没有屏蔽作用，仍然会产生沉淀和蛋白带迁移不佳的现象。

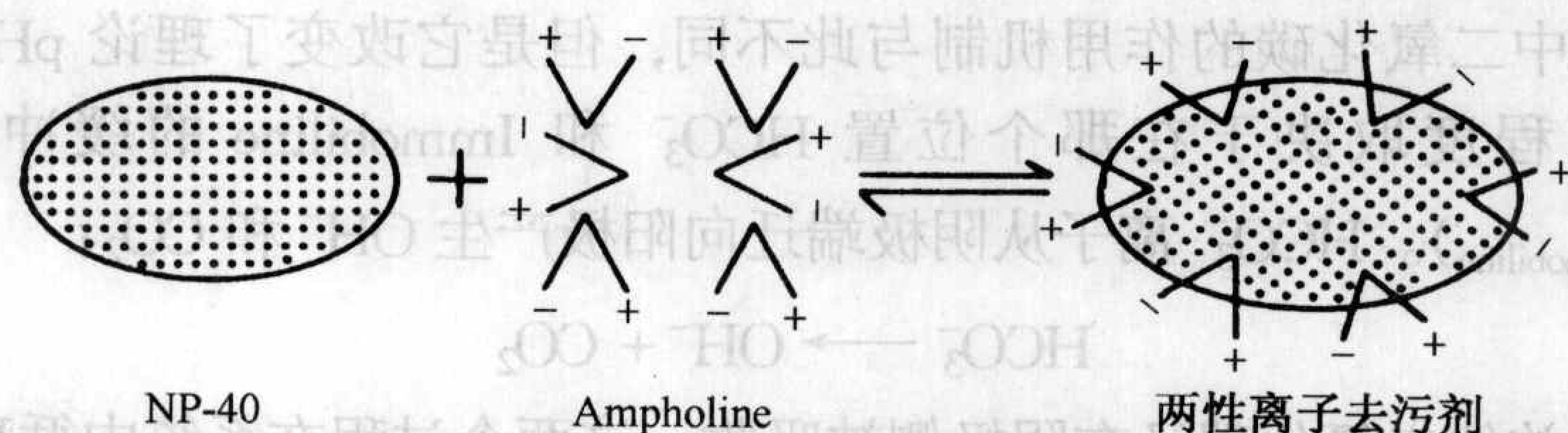


图 7.18　在等电聚焦时，载体两性电解质与中性去污剂形成混合微团的模型[52]

最近 Vuillard 等[53]报道了一种温和的、增加蛋白质可溶性的试剂，这是一种 sulfobetaine 型的非去污剂。它能使微粒体中的膜蛋白和冷冻干燥血小板中的蛋白的溶解度增加 100%。

因为固相 pH 梯度凝胶能被干燥和重新水化，所以添加剂包括载体两性电解质、尿素、去污剂等可以在重泡胀时泡入[54]。寻找合适的添加剂浓度是非常重要的，但报道很不一致。有报道 4%～6%载体两性电解质，2%NP-40 和8mol/L 尿素同时加在凝胶和样品中，可以增加膜蛋白的可溶性而得到很好的分离[52]。但也有报道在载体两性电解质浓度大于 1%，电压大于 100V/cm 时，凝胶会渗出水因而有短路、打火花和烧胶的危险[55]。有报道在窄 pH 范围添加 0.1%～1%载体两性电解质可以增加凝胶的导电性，并将聚焦时间从 14～16 小时缩短为 3～5 小时[56]。类似的报道认为对疏水蛋白和在碱性 pH 范围才添加载体两性电解质，添加量为 0.5%～1%。有时层析用的两性缓冲液 Polybuffer 可以代替昂贵的载体两性电解质[57]。

7.3.8　盐对固相 pH 梯度等电聚焦的影响

样品中的盐对固相 pH 梯度等电聚焦的影响不像对载体两性电解质等电聚焦那样严重。后者在电泳时，载体两性电解质分子在凝胶中自由迁移，所以会干扰 pH 梯度的形成[58]。但前者在电泳时，与 pH 梯度有关的缓冲基团已被共价结合到凝胶介质中，所以盐离子对 pH 梯度影响不大。在固相 pH 梯度等电聚焦以前，

一般不需要对含盐的样品进行透析。但是应该注意到在样品中，强酸和强碱形成的盐（如 NaCl，Na_2SO_4，Na_2HPO_4）在低浓度时（＜5mmol/L）会使蛋白发生修饰变化，如血红蛋白铁的部分被氧化，在高浓度时（＞50mmol/L）甚至使蛋白不可逆变性而产生沉淀。而且这些盐离子和缓冲液离子会迁移到电极条中，使导电性下降，其结果是产生不均一的电流分布以及使凝胶的一些小区过热。

在样品和凝胶中加载体两性电解质也有利于克服样品中盐的影响。载体两性电解质和盐的摩尔浓度比约为1:1。有两种不同情况需在固相 pH 梯度凝胶中加载体两性电解质：①与介质的疏水相互作用；②样品的 pH 控制。对此两种情况应该有不同的策略。第一种情况样品和凝胶中都应当加。第二种情况只要在样品中加，作为样品进入凝胶的转移状态时的 pH 保护[55]。

为了减少盐的影响，固相 pH 梯度等电聚焦在开始时应采用低电压（如500V，4 小时），使蛋白质进入凝胶前不会产生沉淀，高盐浓度的泳道不会过热，使盐有时间进入凝胶并在蛋白迁移前离开凝胶[16]。

7.3.9 电 参 数

如 6.4.9 节中图 6.22 所示，载体两性电解质等电聚焦在达到稳态后，电流降到最小（几个毫安），电压达到一个高的平台（1000～2000V）。但在固相 pH 梯度等电聚焦中，电参数的变化是不同的，如图 7.19。在电泳的最初几分钟内，电流降到几个微安（加样时，电流有一个短时间的增加），电压增加到功率设置许可的最高值（3000～5000V）。功率很低（1W 左右），凝胶上不会过热。因此可在凝胶上施加一个很高的、每厘米几千伏的电压梯度。在这样的电压梯度下，甚至最懒的、最能睡觉的蛋白也能被叫醒而迁移到等电点位置上。

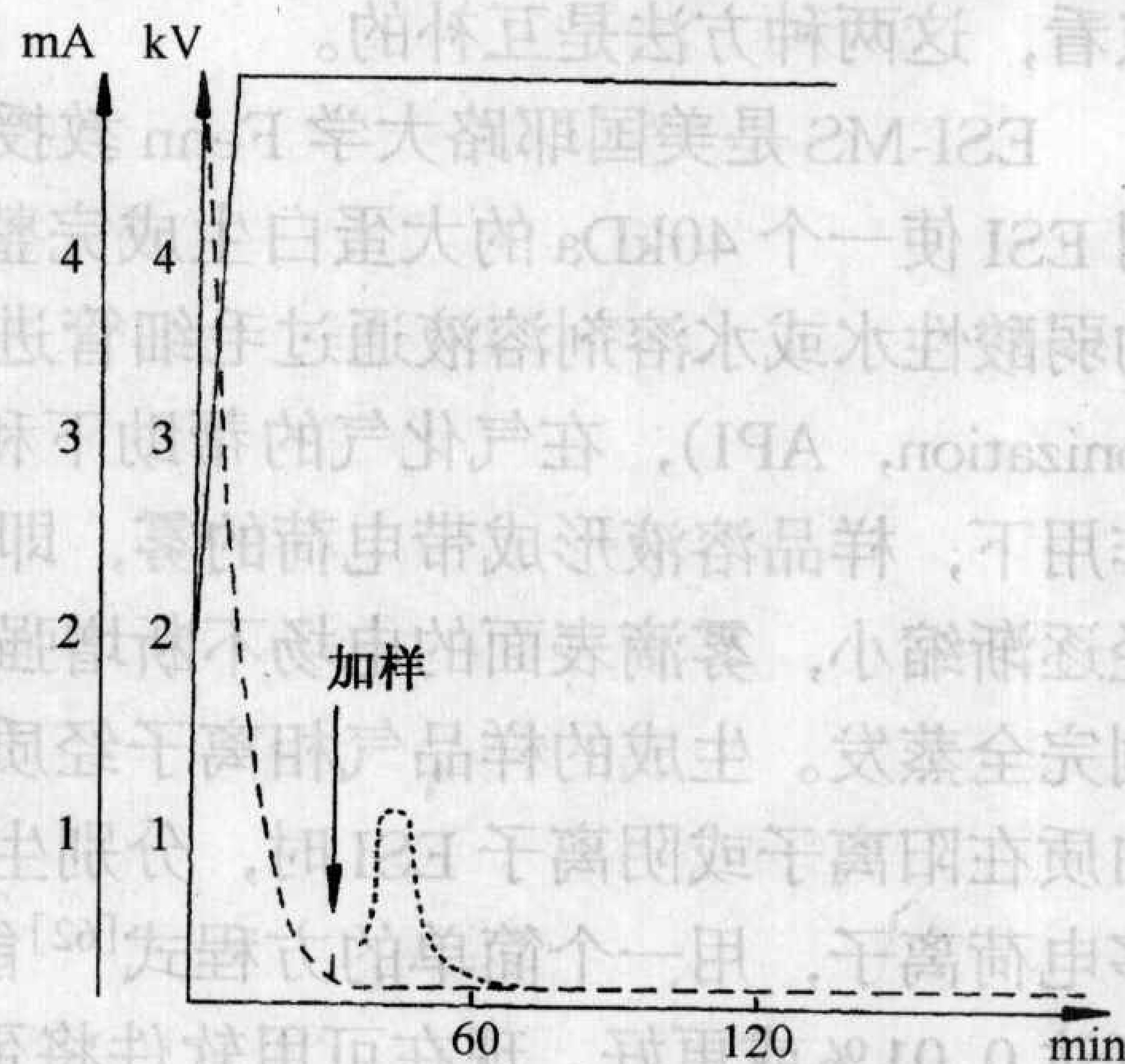


图 7.19 固相 pH 梯度等电聚焦时电流和电压的变化

—— 电压 - - - 电流 …… 加样后的电流

固相 pH 梯度等电聚焦的温度一般设置在 10℃。但如在凝胶和样品中添加尿素时，应将温度设置在 15℃，以免尿素结晶析出。

固相 pH 梯度等电聚焦的电泳时间取决于三个基本参数：pH 梯度的范围、电场强度和蛋白质分子的迁移速度。对窄和超窄 pH 梯度（≤1pH 单位），聚焦通常应该过夜，因为蛋白质已接近它们的等电点，迁移很慢，需要一个长时间才能到达它们的 pI 位置。但是在宽范围 pH

梯度等电聚焦时，蛋白质分子迁移快，电位差也起着重要作用。二倍的电压，一半的聚焦时间。为了得到一个合适的电泳时间，应如6.4.9节所述做一个预备实验，观察不同时间的实验结果，从而确定最佳时间。

7.3.10 等电点的实验测定

Bjellqvist 等[59,60]最近用固相 pH 梯度等电聚焦测得 29 种蛋白的实验 pI 值与从蛋白质氨基酸序列预测的 pI 值只相差 ± 0.01～0.02pH 单位。另外，Bossi 和 Righetti[10,22]从 36 种多肽测得的结果与预测值也有同样好的相关性，如有例外则是由于早先报道的氨基酸序列有误，或者是由于合成修饰后的变化，重新计算后也有很好的相关性。只是对碱性蛋白的测定比较困难，可能是由于碱性 Immobiline pK 值的不确定性有关[10,22]。

7.3.11 与质谱联用

固相 pH 梯度等电聚焦后，用电喷雾电离-质谱（electrospray-mass ionization spectrometry；ESI-MS）技术进一步分析蛋白特性是基于这两种技术原理的不同和重要特性。前者是利用蛋白的表面净电荷，后者则是基于分子质量。从技术观点看，这两种方法是互补的。

ESI-MS 是美国耶路大学 Fenn 教授和他的同事在 80 年代后期提出的。他们用 ESI 使一个 40kDa 的大蛋白生成完整的多电荷气相离子[61]。ESI 是将蛋白质的弱酸性水或水溶剂溶液通过毛细管进入大气压电离源内（Atmosphere Pressure Ionization，API），在气化气的帮助下和源内毛细管终端和反电极之间的强电场作用下，样品溶液形成带电荷的雾，即电喷雾。这些雾滴在热氮气流下蒸发，半径逐渐缩小，雾滴表面的电场不断增强到某一临界点时发生离子的场发射，或溶剂完全蒸发。生成的样品气相离子经质量分析器分析，测出它们的质/荷比。蛋白质在阳离子或阴离子 ESI 时，分别生成一系列 $[M+nH]^{n+}$ 或 $[M-nH]^{n-}$ 的多电荷离子，用一个简单的方程式[62]能精确测出蛋白质的分子质量，质量准确度达 0.01%或更好。现在可用软件将蛋白质的一组多电荷离子转换成通常的质谱图[63,64]。

ESI-MS 的最重要进展是 Wilm 和 Mann 引入了纳电喷雾源（nanoelectrospray ionization source，nanoESI，纳升流速）[65,66]，nanoESI 不仅提高了分析的灵敏度，而且少至 0.5μL 的样品溶液，可得到 30 多分钟的稳定喷雾，以致有充分的机会使 MS 的参数最佳化和进行许多串联质谱分析[29,30]。

ESI-MS 分析时样品溶液是连续不断导入 ESI 源内的，因此 ESI 源能直接与分离技术像 HPLC 和毛细管区带电泳（Capillary Zone Electrophoresis，CZE）联

用[66,67]对样品进行联机分离与鉴定。现在发展起来的自动毛细管反相柱 HPLC-ESI-MS/MS 能高通量鉴定蛋白质[68]。

一些样品，如肌球蛋白，白介素-6-突变体，肿瘤坏死因子，细胞色素 c_{551}，生长因子 I 等都用这两个技术的结合得到了很好的结果[69]。固相 pH 梯度等电聚焦后，用质谱分析蛋白质 N 端和序列的详细研究方法参阅 Righetli[22]、Patterson[70]和杨松成[71]的综述。

7.3.12 电泳过程中出现的问题和解决方法

在第 4、5、6 章中所述的问题和解决办法大部分均适用于固相 pH 梯度等电聚焦。只是该技术难度更大一点，如凝胶聚合时 pH 梯度的形成，长时间电泳对电参数的控制，不易脱色等。但只要掌握它的原理，就能得到满意的结果。为避免重复，这里只列举该技术特有的问题。

(1) 部分凝胶聚合，部分不聚合

由于 Immobiline 凝胶灌注时，在重液中加有甘油，黏度较大，所以在加过硫酸铵后，一定要搅拌混合，否则聚合不完全。

(2) 凝胶的上部（碱性侧）发黏，并易脱离支持膜

这是由于大气中的氧抑制了上部凝胶的聚合。如灌注碱性胶时，在灌胶后立即用双蒸水封胶。

(3) 洗胶时，凝胶表面有木纹状或柱状结构

这是由于缓冲基团的弱交换特性引起的，将凝胶吹干后便可回到正常状态。

(4) 吹胶时凝胶和支持膜卷曲

在最后一次洗胶时，用 1%～2% 甘油溶液代替双蒸水洗胶，使凝胶有弹性。或在吹胶时，用夹子将胶夹在玻璃上。

(5) 凝胶重新水化时不能被泡胀或只有部分被泡胀

1）重泡胀时间不够。如用双蒸水泡胀，约需 1～2 小时。如有添加剂存在，如尿素、去污剂等，泡胀应过夜。

2）干胶时间不要太长，更不要在高温下干胶。

3）贮存时间不要过长，并应在 −20℃ 贮存在密封的包装中。

(6) 电泳时电流太小

由于固相 pH 梯度的低导电性，电流小是正常现象。

7.4 等电聚焦技术的进展

从 30 多年前瑞典科学家 Svensson-Rilbe 建立了等电聚焦的理论和他的学生 Vesterberg 合成了载体两性电解质后，等电聚焦技术以其高分辨率在整个电泳技

术中占有极其重要的地位，并已被世界上农、林、牧、副、渔、医、药等领域的成千上万个生化实验室广泛使用。Righetti 教授在他的 *Immobilized* pH *gradients*：*theory and methodology* 一书中将这个技术的发展过程归纳为 4 个阶段[19]。

7.4.1 第一代等电聚焦

Kolin 在 1954 到 1955 发表的一系列文章中提出了用蔗糖密度梯度建立“在连续 pH 梯度下聚焦离子”的想法，并定名为“等电谱”(isoelectric spectrum)[72~74]。他设计了 U 型电解槽，利用酸性和碱性溶液在电解槽内扩散形成的 pH 梯度使染料、蛋白、细胞、病毒在短时间得到分离。

7.4.2 第二代等电聚焦

Kolin 的 pH 梯度是由非两性电解质离子扩散形成的，不能在电泳过程中保持稳定，其 pH 梯度很容易被离子迁移所破坏。1961 和 1962 年，Svesson[75~77] 提出了在电场中建立稳定 pH 梯度的最基本要求的重要理论概念，并将这种物质定名为“载体两性电解质”。他认为能形成稳定 pH 梯度的缓冲体系必须具备两个性质：

1）具有两性电解质性质，因而可在电场中某位置上稳定；
2）具有“载体”性质，即有良好的导电性（电流的良好载体）和良好的缓冲能力（pH 的良好载体）。

1964 年春，Vesterberg 最终根据他老师的理论，利用不饱和羧酸和寡胺的双键加成反应，合成了 pH3～10 的载体两性电解质。由此等电聚焦技术得以建立和发展。

Svensson 教授，1968 年改名为 Rilbe，由于他对等电聚焦理论的杰出贡献被誉为“等电聚焦之父”。在他虽已高龄，行动不便时仍不断发表文章[78~80]。1994 年作者有幸在芬兰举行的北欧电泳年会上聆听了他的精彩报告。

7.4.3 第三代等电聚焦

1975 年 Gasparic 和 Bjellqvist 等[1]首先将丙烯和乙烯混合物连接到丙烯双键上合成了 Immobiline。在那个时期，Righetti 在合成方面也做了不少努力[19]，Görg 等则致力于超薄层和薄层梯度胶的灌制[81,82]。经过这些研究组的协作努力，终于在 1982 年[2]完成了第三代等电聚焦技术。1988 年，原 Pharmacia-LKB 公司克服了 Immobiline 的水解和自聚合问题，推出了 Immobiline Ⅱ[3]，使第三代等电聚焦技术更加完善。

7.4.4 第四代等电聚焦

如7.3.1节所述，虽然固相pH梯度等电聚焦克服了载体两性电解质等电聚焦的一些缺点，但它本身也存在一些问题。1985年Rimpilainen和Righetti[52]建立了第四代等电聚焦技术，即在固相pH梯度凝胶中加入载体两性电解质作为添加剂的载体两性电解质/固相pH梯度混合技术，见图7.20。由于载体两性电解质起了屏蔽分子的作用，遮挡了蛋白质分子表面的疏水基团，明显地增加了蛋白质分子的溶解度。同时由于载体两性电解质的导电性高于固相pH梯度凝胶，使载体两性电解质/固相pH梯度凝胶的电泳时间明显缩短。目前这个技术已由Görg等[83~88]成功地用作为双向电泳的第一向，并把它称为“杂交等电聚焦”(hybrid isoelectric focusing)[88]。

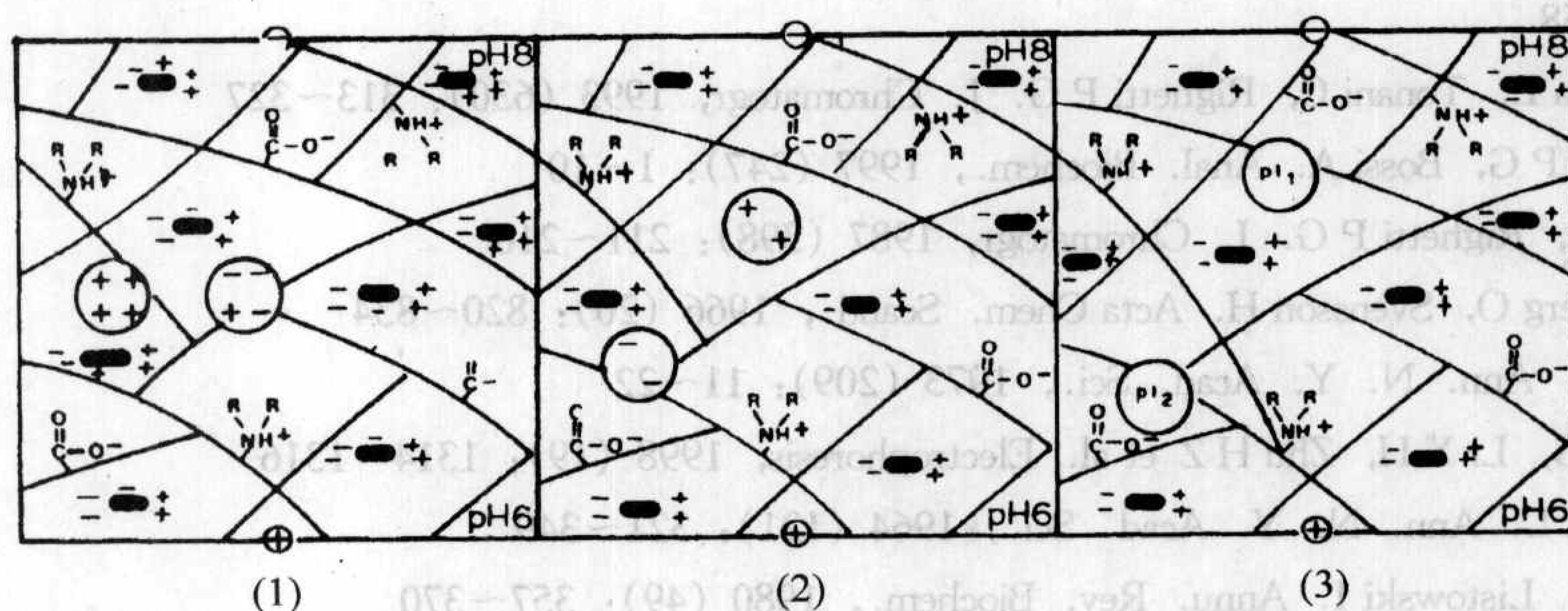


图7.20　第四代载体两性电解质/固相pH梯度混合凝胶等电聚焦[19]

(1) 加样；(2) 蛋白质分子开始迁移；(3) 蛋白质分子到达等电点位置

从30多年等电聚焦技术的发展中，特别是固相pH梯度技术的发展，到处可以看到意大利米兰大学Righetti教授的工作。为了表彰他在等电聚焦技术上的重要贡献，在美国西雅图举行的1997国际电泳年会上，英国皇家电泳学会给他授了奖。

参考文献

[1] Gasparic V, Bjellqvist B, Rosengren Å, Swedish patent 14049-1 (1975), US patent 4130470 (1978), French patent 7637402 (1980), British patent 1570698 (granted) and German patent 2656162 (1981)

[2] Bjellqvist B, Ek K, Righetti P G, Gianazza E, Görg A, Westermeier R, Postel W. J. Biochem. Biophys. Methods, 1982 (6): 317~339

[3] Righetti P G, Immobilized pH Gradients: Theory and Methodology, Elsevier, Amsterdam. 1990, 13~51

[4] Chiari M., Righetti P G. Electrophoresis, 1992 (13): 187~191

[5] Gelfi C, Righetti P G. Electrophoresis, 1984 (5): 257~262

[6] Pietta P G, Pocaterra E, Forino A, Gianazza E, Righetti P G. Electrophoresis, 1985 (6): 162~170

[7] Righetti P G, Gelfi C, Bossi ML, Boschetti E. Electrophoresis, 1987 (8): 62～70
[8] Righetti P G, Gelfi C, Bossi ML. J. Chromatogr, 1987 (392): 123～132
[9] Righetti P G, Chiari M, Casale E, Chiesa C. Appl. Theor. Electrophoresis, 1989 (1): 115～121
[10] Bossi A, Righetti P G, Chiari M. Electrophoresis, 1994 (15): 1112～1117
[11] Chiari M, Micheletti C, Nesi M et al. Electrophoresis, 1994 (15): 177～186
[12] Bossi A, Righetti P G, Vecchio G et al. Electrophoresis, 1994 (15): 1 535～1 540
[13] Righetti P G, Gelfi C. J. Biochem. Biophys. Methods, 1984 (9): 103～119
[14] Righetti P G. Immobilized pH Gradients: Theory and Methodology, Elsevier, Amsterdam. 1990. 54～56
[15] 郭尧君，郭强，黄力力等. 生物化学与生物物理进展，1994 (21): 356～359
[16] Users manual of Multiphor Ⅱ Electrophoresis system. Pharmacia LKB Biotechnology AB 1992 p. 94～106
[17] Righetti P G. Immobilized pH gradients: Theory and Methodology, Elsevier, Amsterdam 1990. 69～79
[18] 郭尧君，李辛晖，朱海珍等. 生物化学与生物物理进展，1997 (24): 540～542
[19] Righetti P G. Immobilized pH gradients: Theory and Methodology, Elsevier, Amsterdam 1990. 5～12
[20] Celentano F, Gianazza E, Dossi G, Righetti P G. Chemometr. Intel. Lab. Systems, 1987 (1): 349～358
[21] Giaffreda E, Tonani C, Righetti P G. J. Chromatogr, 1993 (630): 313～327
[22] Righetti P G, Bossi A. Anal. Biochem., 1997 (247): 1～10
[23] Cossu G, Righetti P G. J. Chromatogr, 1987 (398): 211～216
[24] Vesterberg O, Svensson H. Acta Chem. Scand., 1966 (20): 820～834
[25] Rilbe H. Ann. N. Y. Acad. Sci., 1973 (209): 11～22
[26] Guo Y G, Li X H, Zhu H Z et al. Electrophoresis, 1998 (19): 1314～1316
[27] Ornstein L. Ann. N. Y. Acad. Sci., 1964 (121): 321～349
[28] Aisen P, Listowski I. Annu. Rev. Biochem., 1980 (49): 357～370
[29] Pon L A, Hartigan J A, Orme-Johnson N R. J. Biol. Chem., 1986 (261): 13 309～13 314
[30] Isenberg I. Annu. Rev. Biochem., 1979 (48): 159～170
[31] Anderson N L, Hickman B J. Anal. Biochem., 1979 (93): 312～3120
[32] Righetti P G, Barzaghi B, Sarubbi E, Soffientini A, Cassani G. J. Chromatogr, 1989 (470): 337～350
[33] Whitehart S W, Shenbagamurthi P, Chen L, Cotter R J, Hart G W. J. Biol. Chem., 1989 (264): 14 334～14 339
[34] Paik W K. Methods Enzymol, 1984 (106): 265～273
[35] Paik W K, DiMaria P. Methods Enzymol, 1984 (106): 274～280
[36] Ueda K, Hayashi O. Annu. Rev. Biochem, 1985 (54): 73～81
[37] Wielckens K, Bredehorst R, Hilz H. Methods Enzymol, 1984 (106): 472～480
[38] Finley D, Chau, V. Annu. Rev. Cell Biol., 1991 (7): 25～31
[39] Busch H. Methods Enzymol, 1984 (106): 238～244
[40] Righetti P G, Drysdale J W. Ann. N. Y. Acad. Sci., 1973 (209): 163～183
[41] 郭尧君，郭强. 生物化学与生物物理进展，1994 (21): 143～146
[42] Righetti P G, Immobilized pH gradients: Theory and Methodology, Elsevier Amsterdam 1990. 132～139
[43] Ek K, Bjellqvist B, Righetti P G. J. Biochem. Biophys. Mcthods, 1983 (8): 135～155
[44] Righetti P G, Immobilized pH gradients: Theory and Methodology, Elsevier Amsterdam 1990. 96～103
[45] Debye P, Hückel E. Physik Z., 1924 (24): 305～330

[46] Gianazza E, Dossi G, Celentano F, Righetti P G. J. Biochem. Biophys. Methods, 1983 (8): 109～133
[47] Gianazza E, Celentano F, Dossi G, Bjellqvist B, Righetti P G. Electrophoresis, 1984 (5): 88～97
[48] Gelfi C, Righetti P G. J. Biochem. Biophys. Methods, 1983 (8): 156～171
[49] Righetti P G, Hjertèn S. J. Biochem. Biophys. Methods, 1981 (5): 259～272
[50] Delincèe H, Radola B. J. Anal. Biochem., 1978 (90): 609～623
[51] Altland K et al. Electrophoresis, 1988 (9): 474～483
[52] Rimpilainen M A, Righetti P G. Electrophoresis, 1985 (6): 419～422
[53] Vuillard L, Marret N, Rabilloud T. Electrophoresis, 1995 (16): 295～297
[54] Righetti P G, Immobilized pH gradients: Theory and Methodology, Elsevier Amsterdam 1990. 161～171
[55] Altland K, Banzhoff A, Hackler R, Rossmann U. Electrophoresis, 1984 (5): 379～381
[56] Altland K, Rossmann U. Electrophoresis, 1985 (6): 314～325
[57] Rabilloud T, Barzaghi B, Righetti P G. J. Biochem. Biophys. Methods, 1988 (16): 237～241
[58] Jonsson M. Electrophoresis, 1980 (1) 141～149
[59] Bjellqvist B, Hughes G J, Pasquali C, Paquet N, Ravier F, Sanchez J C, Frutiger S, Hochstrasser D. Electrophoresis, 1993 (14): 1023～1031
[60] Bjellqvist B, Basse B, Olsen E, Celis J E. Electrophoresis, 1994 (15): 529～539
[61] Fenn JB, et al. Science, 1989 (246): 64
[62] Mann M, et al. Anal. chem. 1989 (61): 1702
[63] Reinhold BB, et al. J. Am. Soc. Mass. Spectrom 1992 (3): 207
[64] Wilm M., Mann M. Anal. chem. 1996 (66): 1
[65] Wilm M., et al. Nature, 1996 (379): 466
[66] Smith RD., et al. Anal. chem. 1993 (65): 574A
[67] Emmett MR., et al. J. Am. Soc. Mass. Spectrom 1994 (5): 605
[68] Ducret A. et al. Procein Sci. 1998 (7): 706
[69] Breme U, Breton J, Visco C, Orsini G, Righetti P G. Electrophoresis, 1995 (16): 1381～1384
[70] Patterson S D, Aebersold R. Electrophoresis, 1995 (16): 1791～1814
[71] 杨松成. 现代科学仪器. 2000 (5): 9～15
[72] Kolin A. J. Chem. Phys., 1954 (22): 1628～1629
[73] Kolin A. J. Chem. Phys., 1955 (23): 407～410
[74] Kolin A. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1955 (41): 101～110
[75] Svensson H. Acta Chem. Scand., 1961 (15): 325～341
[76] Svensson H. Acta Chem. Scand., 1962 (16): 456～466
[77] Svensson H. Arch. Biochem. Biophys. Suppl., 1962 (1): 132～140
[78] Rilbe H. Electrophoresis, 1994 (15): 580～583
[79] Rilbe H. Electrophoresis, 1994 (15): 932～935
[80] Rilbe H. Electrophoresis, 1995 (16): 1354～1359
[81] Görg A, Postel W, Westermeier R. Anal. Biochem., 1978 (89): 60～70
[82] Görg A, Postel W, Westermeier R, Gianazza E, Righetti P G. J. Biochem. Biophys. Methods 1980 (3): 273～284
[83] Görg A, Postel W, Weser J, Günther S, Strahler J R, Hanash S M, Somerlot L. Electrophoresis, 1987 (8): 45～51
[84] Görg A, Postel W, Weser J, Günther S, Strahler J R, Hanash S M, Somerlot L. Electrophoresis,

1987 (8): 122~124
[85] Görg A, Postel W, Günther S, Weser J, Strahler J R, Hanash SM, Somerlot L, Kuick R. Electrophoresis, 1988 (9): 37~46
[86] Görg A, Postel W, Domscheit A, Günther S. Electrophoresis, 1988 (9): 681~692
[87] Görg A. Nature, 1991 (349): 545~546
[88] Görg A, Postel W, Günther S et al. Electrophoresis, 1985 (6): 599~604

第8章 双向电泳

近年来生命科学领域发生了革命性的变化，对于生命活动的研究正从传统的还原式研究转向整体式研究，因为仅仅依靠对细胞各个组成成分的孤立研究是无法了解细胞如何行使功能的。系统生物学是通过对细胞所有组分的定量描述从而在系统水平上了解生命活动的一个新型交叉学科。它以基因组学（功能基因组学）和蛋白质组学为基础，通过实验观察和数学建模的反复迭代过程来描述和预测生物系统的动态行为。

蛋白质组学是系统生物学的基础和组成部分之一，在后基因组学时代的地位尤为突出。蛋白质组学的内容包括三个部分：表达蛋白质组学（expression proteomics）、结构蛋白质组学（structural proteomics）和功能蛋白质组学（functional proteomics）。双向电泳是蛋白质组学研究的经典方法之一，特别是对于表达蛋白质学的研究是不可缺少的手段。

双向电泳（two-dimentionlal gel electrophoresis，2-DE）技术，特别是以固相pH梯度等电聚焦为第一向的双向电泳技术是当前分辨率最高，信息量最大的电泳技术。目前，双向电泳最高可达到11 000个蛋白点的分辨率[1]。所以在上世纪90年代中期Wilkins[2]提出蛋白质组学这一概念后，双向电泳立即成为这个革命性课题的开门技术[3]，因为双向电泳能将组织和细胞中成千上万种蛋白高分辨，高灵敏的分离以满足随后的质谱分析。尽管随着蛋白质组学研究的飞速发展，近年来各种新技术不断萌生，如多维液相色谱-质谱联用、表面等离子体共振-生物分子相互作用分析（SPR-BIA）、生物芯片技术等等。但到目前为止，双向电泳仍然以它的高分辨、高灵敏以及新技术的引入（如窄pH梯度、荧光差异标记技术等）而占用重要的地位。就像Rabilloud[4]所说：“双向电泳是很经典的技术了，可它却仍然在不断发展”。Fey和Larsen[5]在他们的综述中也认为：“尽管人们都想有新技术取代它，可是如果希望对细胞活动有全面认识，其他技术仍无法在分辨率和灵敏度上与双向电泳相媲美。近来（双向电泳）也有技术上的发展，如低丰度蛋白的检测和用窄范围的固相pH梯度凝胶提高分辨率”。

8.1 原　理

双向电泳广义的定义是将样品进行电泳后，在它的直角方向再进行一次电泳，为了不同的目的可采用不同的组合方式，如表8.1。

表 8.1　双向电泳的种类

第　一　向	第　二　向
等电聚焦 (载体两性电解质 pH 梯度 或固相 pH 梯度)	常规聚丙烯酰胺凝胶电泳（滴定曲线*） SDS 电泳 免疫电泳 等速电泳 电泳转移
SDS 电泳	等电聚焦

*第一向电泳时不加样品。

但是目前双向电泳大多是指第一向为等电聚焦（载体两性电解质 pH 梯度或固相 pH 梯度），平衡后，第二向为 SDS 电泳。样品中的蛋白质根据电荷和质量两次分离后，可以得到分子的等电点、分子质量和表达量等信息。分离的结果不是带而是点。根据 Cartesin 坐标系统，从左到右是 pI 的增加，从下到上是分子质量的增加。

从 1975 年 O'Farrell[6] 和 Klose[7] 提出聚丙烯酰胺凝胶双向电泳至今，电泳方式从管状，垂直到水平电泳，随着双向电泳第一向的等电聚焦技术的进展，载体两性电解质 pH 梯度，固相 pH 梯度及其二者的“杂交”技术被引入到双向电泳中，无疑对提高双向电泳的分辨率和重复性以及碱性蛋白的分析是极为有用的。

电泳技术虽然是蛋白质分析的有用工具，但传统的单向电泳方法最多只能分离约 100 种蛋白[8,9]，所以它不适合分析细胞和亚细胞中的蛋白混合物。如果采用两种不同原理的电泳程序，特别是基于两种不同物化参数的电泳程序的结合，就能使分辨率提高几个数量级。见图 8.1。所以双向电泳便成为当前蛋白质组学分析的关键开门技术。

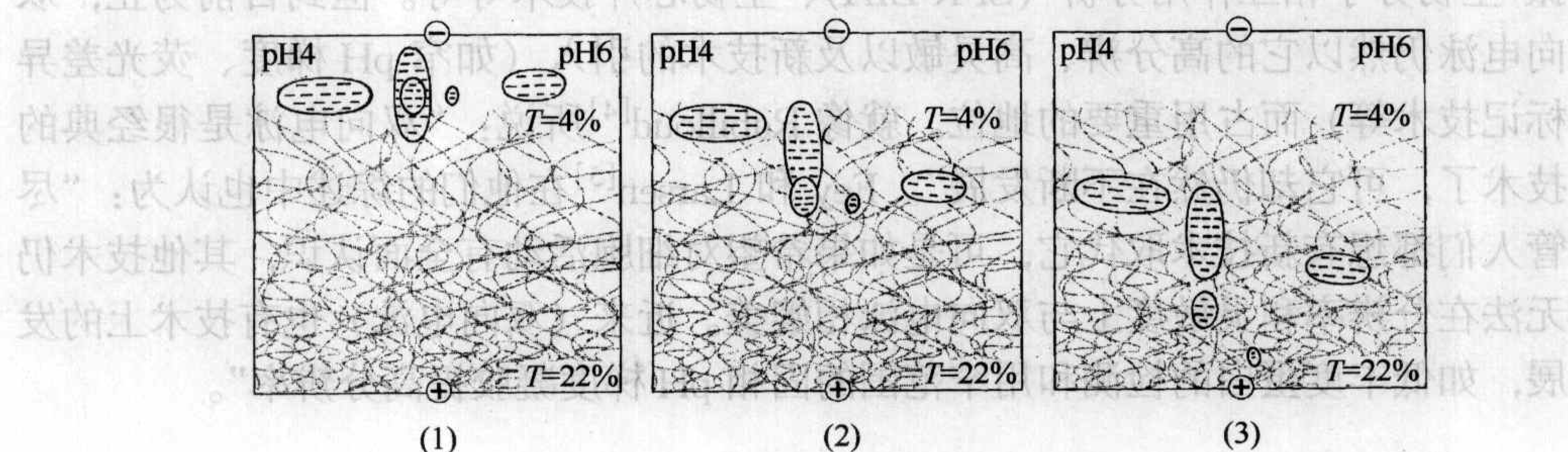


图 8.1　双向电泳的原理

(1) 将样品等电聚焦后的凝胶条放在 SDS 凝胶的浓缩胶上；
(2) 开始 SDS 电泳；(3) 电泳结束

8.1.1 O'Farrell 系统—ISO-DALT 系统

双向电泳最重要的改进是将基于电荷特性分离的等电聚焦作为第一向，随后用含有阴离子去污剂的 SDS 电泳作为第二向。这样的分离是完全基于蛋白质的两个独立的物化参数——电荷和亚基分子质量大小。见图 8.2。为了增加蛋白的可溶性，避免蛋白发生沉淀，需要在第一向电泳中加尿素[10,12]，非离子或两性离子去污剂如 Triton 等[13,14]和还原剂，这样双向电泳技术就可对组织和整个细胞中的蛋白进行高分辨分析[15,17]。

■ 第一向:

变性等电聚焦

根据等电点分离

■ 第二向:

SDS电泳

根据分子质量分离

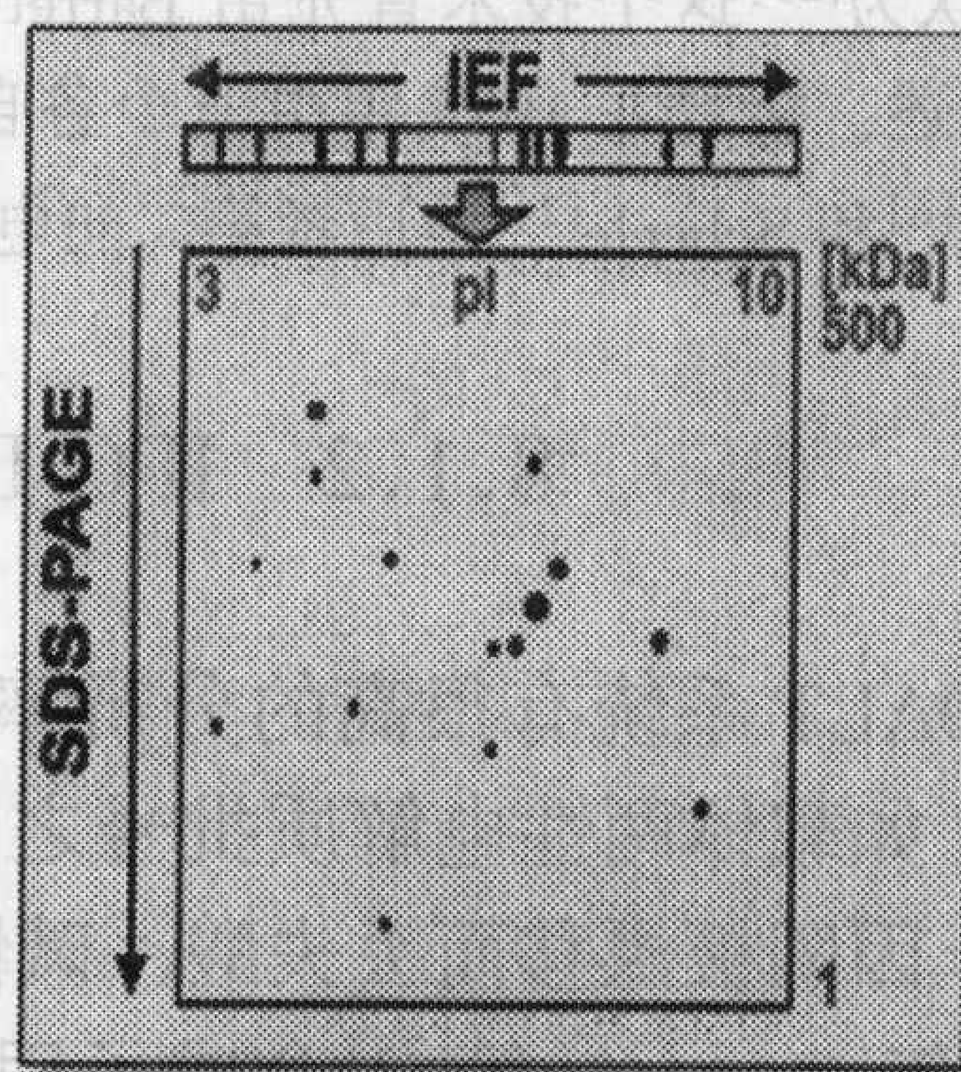


图 8.2　双向电泳的原理

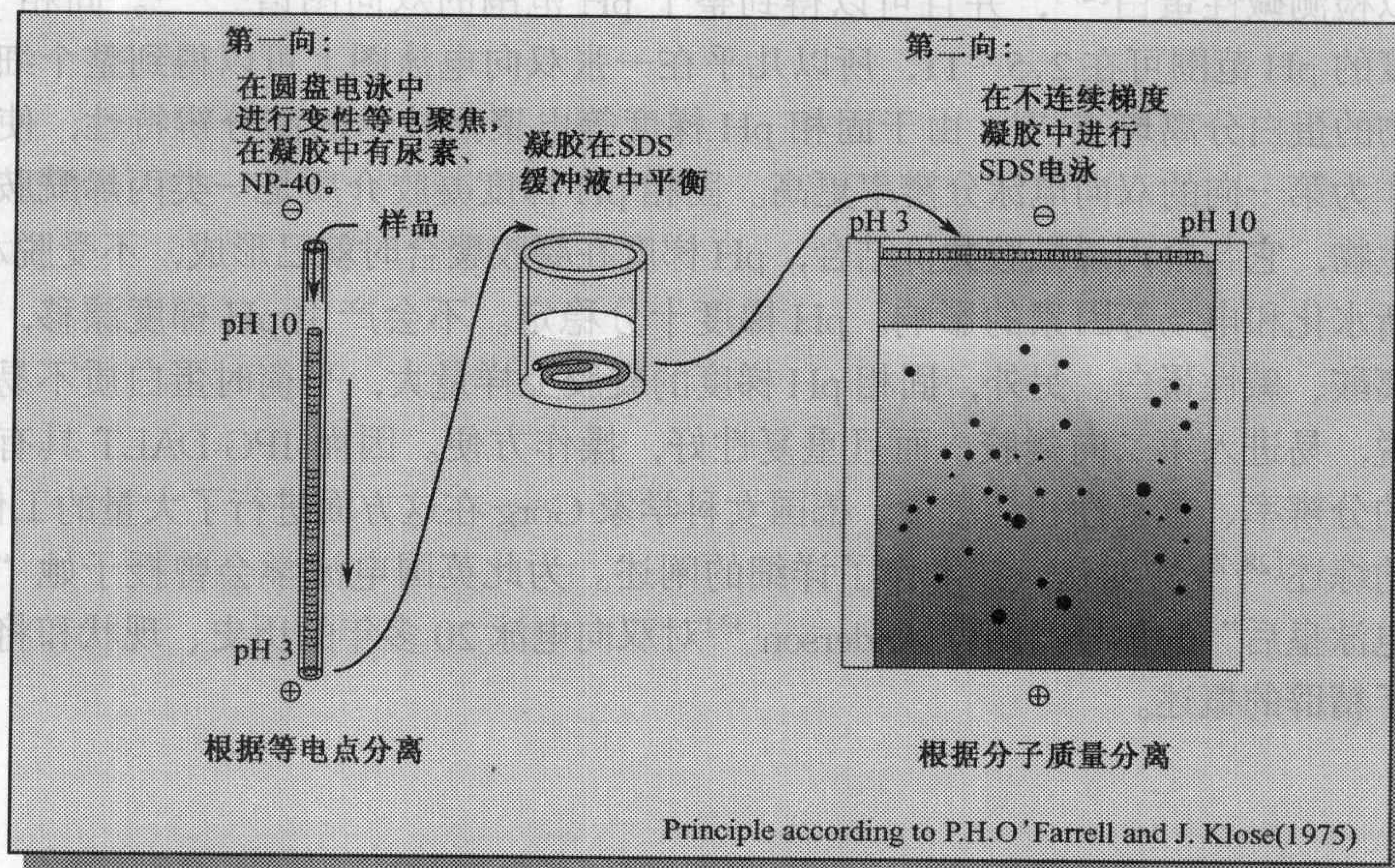


图 8.3　O'Farrell 和 Klose 双向电泳的经典方法

1975 年 O'Farrell[6]和 Klose[7]首先分别提出（现在已成为经典）双向电泳系统。用含有 9mol/L 尿素、2%NP-40、4%T、5%C 的管状载体两性电解质凝胶等电聚焦作为第一向，聚焦后的凝胶在含 SDS 的缓冲液中平衡后，以琼脂糖包埋于垂直板状 SDS 凝胶的浓缩胶上，用 Laemmli 的不连续 SDS 梯度凝胶电泳作第二向见图 8.3，并利用放射自显影的方法得到了大肠杆菌蛋白提取液的 1100 种不同组分的 5000 个蛋白点的图谱[6]。由于这个技术的极高的分辨率，它被称为“蛋白爆炸”（Protein cxplosion）技术[18]。Anderson[19,20]把这种等电聚焦—SDS 电泳技术称之为 ISO-DALT（ISO 即等电点，DALT 即道尔顿）。Dunn[8,9]对 ISO-DALT 技术的进展进行了全面的综述。

注：Righetti 认为[21]这个技术首先由 Barrett 等[22]在 1973 年报道，随后由 MacGillivray 等[23]在 1974 年阐述，接着在 1975 年由三个各自独立的研究小组介绍了这个技术，他们是 Klose[7]、O'Farrell[6]和 Scheele[24]，后者第二向电泳是采用小孔梯度常规聚丙烯酰凝胶电泳。

8.1.2 IPG-DALT 系统

尽管 ISO-DALT 系统有很高的分辨率，但有很多问题需要解决，而且问题主要在第一向，如载体两性电解质批号之间的差异，pH 梯度不稳定，受电场和时间的影响大，因阴极漂移而丢失酸，碱性蛋白，加样量少，重复性不好等。

自从 1975 年 Gasparic 等[25]合成了固相 pH 梯度凝胶介质，1982 年，固相 pH 梯度等电聚焦技术基本完善[26]。使用固相 pH 梯度等电聚焦作第一向，不但可以检测碱性蛋白[27]，并且可以得到整个 pH 范围的双向图谱[28,30]。固相 pH 梯度的 pH 范围可在 2.5～11，所以几乎在一张双向电泳图上可以得到整个细胞产物的蛋白分离斑点[31]。由于固相 pH 梯度等电聚焦技术的高分辨特性，使以它作为第一向的双向电泳分辨率更高。固相 pH 梯度凝胶介质是一类丙烯酰胺的衍生物，它与聚丙烯酰胺共价结合，pH 梯度在凝胶聚合时就已形成，不受脱水、重新水化和电场等因素的影响，pH 梯度十分稳定。不会产生 pH 梯度漂移，能分离酸、碱性蛋白。另外，固相 pH 梯度的凝胶上样量大，平衡时蛋白质不易被洗脱，易进入第二向凝胶，而且重复性好，操作方便。因而 IPG-DALT 具有更高的分辨率、重复性和信息量。德国女科学家 Görg 在这方面进行了大量的工作，她的综述[28,29,32]对这一技术作了详细的阐述。为此英国电泳学会曾授予她“双向电泳皇后”的称号。两位 Anderson[33]对双向电泳 20 多年的历史、现状和将来做了精辟的概述。

8.2 方 法

8.2.1 ISO-DALT方法

第一向

8.2.1.1 等电聚焦凝胶的准备

双向电泳通常用聚丙烯酰胺凝胶作介质，但需含有8mol/L尿素、0.5%～2%非离子或两性离子去污剂[34]。为了增加样品的可溶性，可加0.5% CHAPS[35,36]。在第一向电泳中，最重要的是用载体两性电解质建立pH梯度。如第6章所述混合不同pH范围的载体两性电解质或使用预混合的载体两性电解质可以增加第一向电泳的分辨率[34]。

O'Farrell的ISO-DALT系统的第一向是用管状凝胶，虽然也能得到高分辨，且上样量大，对盐的耐受量也大，但会由于电内渗效应丢失碱性蛋白。平板等电聚焦时电极只与凝胶的边缘接触，电解体积小，阴极漂移小。相对来说不易丢失蛋白。将薄层凝胶聚合在支持膜上更能得到好的结果[34,36,37]。

含有尿素、离子去污剂和载体两性电解质的凝胶聚合方法请参阅第6章有关章节。

8.2.1.2 样品准备和加样

可溶蛋白的样品，如体液，细胞和组织的萃取液能直接用于双向电泳，但应稀释到合适的浓度。固体样品，如组织，细胞或在组织培养液中的细胞，加样前应先破碎，研磨和溶解。通常使用的溶解液是O'Farrell提出的9mol/L尿素和2%（*W*/*V*）非离子去污剂（NP-40或Triton X-100）[6]。但对有些蛋白，如组蛋白[38]、核糖体蛋白[6]和膜蛋白[39]的溶解仍然是困难的，必须做适当处理。

使用管状凝胶和垂直平板凝胶时，样品被加在浓缩胶的顶上，靠近电极容易引起蛋白的变化，水平电泳可加在凝胶的合适位置。有关样品的溶解、加样方法、加样量等请参阅第6章的相关章节。

8.2.1.3 等电聚焦

等电聚焦的方法同第6章中所述。由于双向电泳用的第一向凝胶和样品中含有尿素和去污剂，聚焦时的温度应稍高于通常用的温度，如15～20℃，以防止尿素结晶。如在凝胶上覆盖一层膜，也可以防止尿素结晶，并克服大气中二氧化碳的影响。由于尿素使蛋白变性，会增加蛋白分子的直径。鉴于以上一些原因，应使用新鲜样品和凝胶，并适当降低电压和增加聚焦时间[40,41]。

8.2.1.4 pH 梯度的测定

如采用表面电极进行测量，由于尿素和温度对 pH 的影响，应使用校正因子[42,43]，请参阅第 6 章的有关章节。

另一种方法是用蛋白标准作为内标准[44,45]。常用的等电点蛋白标准不能用于双向分析，因为电泳条件不同。双向电泳的标准是选择一些合适的蛋白，在有尿素时加热不同时间得到的[46~48]，最终在双向凝胶上呈现以一定 pH 单位间隔排列的点，点的数目取决于蛋白质氨基酸的组成。

8.2.1.5 平衡

第二向 SDS 电泳前，将等电聚焦凝胶按样品泳道剪成胶条，用含有 SDS，在还原条件下的 pH8.8Tris 缓冲液平衡。目的是使蛋白质分子与 SDS 和还原试剂充分相互作用，解聚蛋白质分子，并与 SDS 结合形成带负电荷的蛋白质-SDS 胶束，以确保第二向的迁移。平衡时间是很重要的因素。柱状胶约需 30～40 分钟[6]，薄层胶（0.5～1mm）约需 5～10 分钟[34]，超薄胶只需 1～2 分钟[37]。

第二向

8.2.1.6 SDS 凝胶的准备

请参阅第 5 章各种不连续 SDS 凝胶灌注方法。

8.2.1.7 二向间的转移

平衡后的等电聚焦凝胶条与 SDS 凝胶的良好接触是双向电泳结果的保证。管状凝胶的转移需要用琼脂糖密封，但琼脂糖中的不纯物在银染时会显现斑点[6]。如用快速丙烯酰胺聚合的方法[49,50]，聚合过程中产生的热会使蛋白变性。

垂直平板电泳时凝胶间的转移可以直接放置，但要防止胶条被拉长，否则蛋白带会歪斜而使双向电泳谱畸变[51]。薄层水平电泳间的转移比较容易，因为凝胶聚合在支持膜上，只要将等电聚焦凝胶的胶面向下，贴于 SDS 凝胶上，避免气泡陷入即可[37]。为了以后分子质量的测定，在 SDS 凝胶的一端应加分子质量蛋白标准。

8.2.1.8 SDS 电泳

请参阅第 5 章 SDS 电泳的方法。

8.2.1.9 检测

考马斯亮蓝染色、银染色、荧光标记、放射自显影等检测方法请参阅第 4 和

第 5 章。由于双向电泳的高分辨率，分离的蛋白斑点无法用肉眼来比较和辨别，应该用凝胶扫描或摄录系统将数据进行处理。

8.2.2 IPG-DALT 方法

第一向

8.2.2.1 固相 pH 梯度凝胶或凝胶条的准备

固相 pH 梯度凝胶的灌注及聚合方法请参阅第 7 章有关章节，如需要可切成 3～5mm 宽的胶条在 − 20℃ 保存一年[28, 32]。为避免繁琐和复杂的灌胶和切胶条程序和保证重复性，可从市场上购置凝胶条使用。市场上有不同长度和不同 pH 范围的固相 pH 梯度凝胶干胶条可供选择，长度最短为 7cm，最长为 24cm。pH 范围有宽范围，窄范围和极窄范围。GE 医疗集团、安玛西亚公司在 pH 范围方面有更多的选择，见图 8.4。凝胶条长度的选择取决于第二向水平或垂直电泳槽的宽度，pH 范围的选择则取决于分辨率的要求和样品的特性。

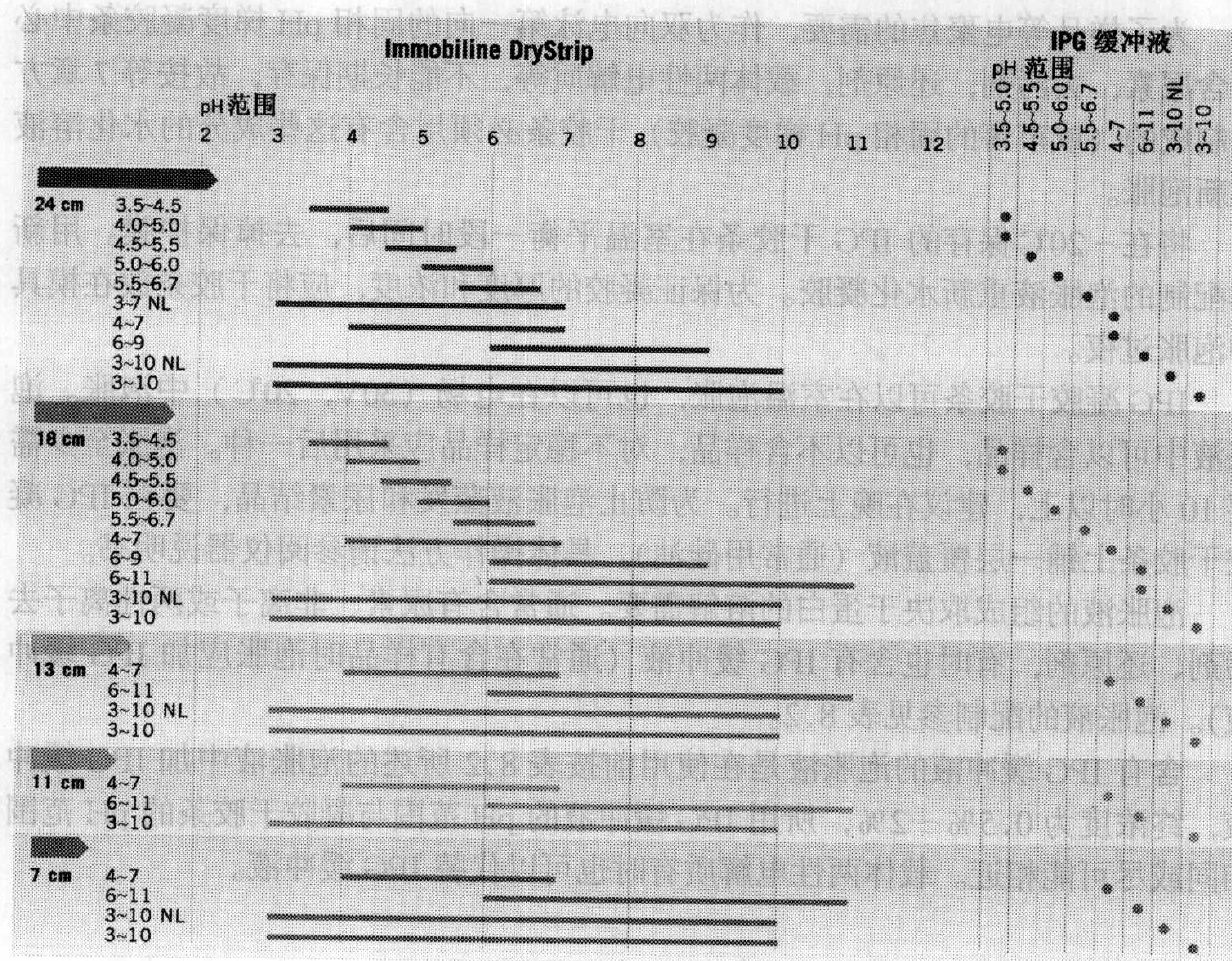


图 8.4 IPG 凝胶条的 pH 范围

在一些 pH 范围，凝胶条分为线性和非线性（non-linear，NL）pH 梯度两种。前者是指 pH 梯度在凝胶中线性分布。后者是指在凝胶中的某一区间 pH 梯度的斜率小，因而在此区间的分辨率高，如图 8.5（b）pH3～10NL 中 pH5～7 的三个斑点（椭圆中）比图 8.5（a）的三个斑点要分得开。

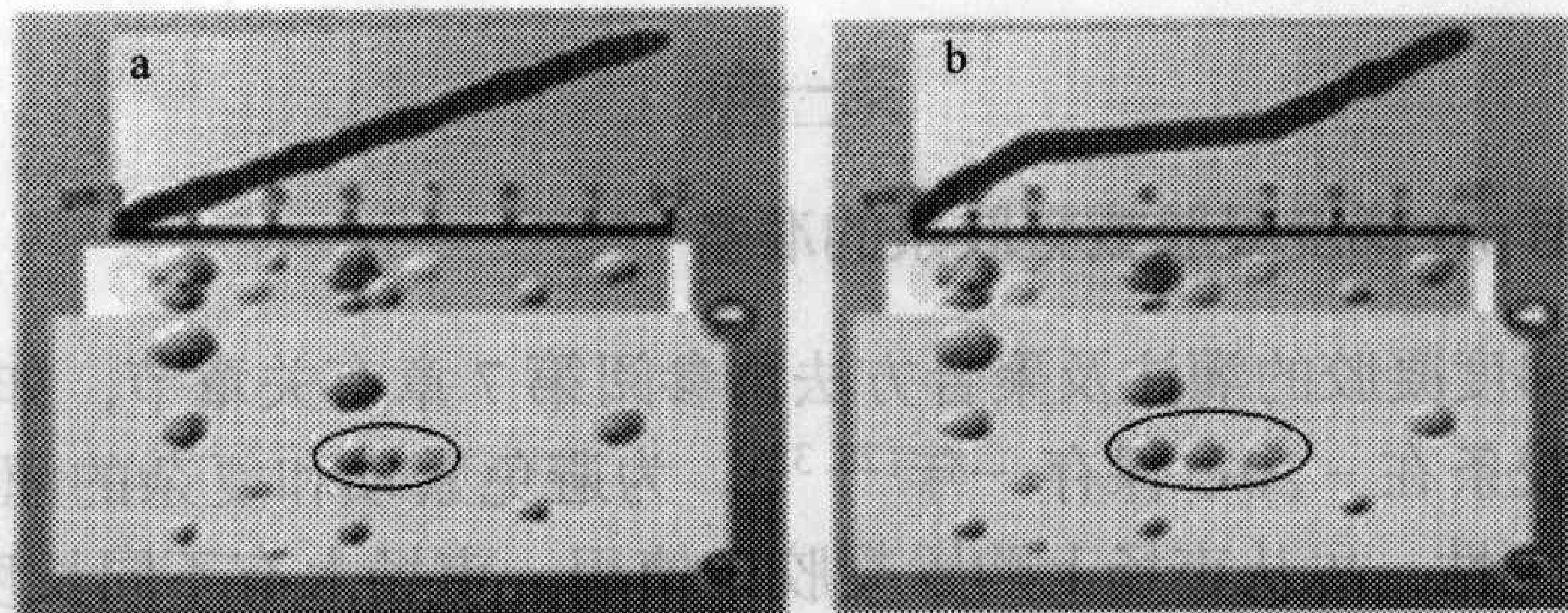


图 8.5 线性（a）和非线性（b）固相 pH 梯度凝胶干胶条

8.2.2.2 IPG 凝胶干胶条的再水化（泡胀）

为了样品等电聚焦的需要，作为双向电泳第一向的固相 pH 梯度凝胶条中必须含尿素，去污剂，还原剂，载体两性电解质等，不能长期保存，故按等 7 章方法制成的（或市售的固相 pH 梯度凝胶）干胶条必须用含有这些成分的水化溶液重新泡胀。

将在 -20℃ 保存的 IPG 干胶条在室温平衡一段时间后，去掉保护膜。用新鲜配制的泡胀液重新水化凝胶。为保证凝胶的厚度和浓度，应将干胶条放在模具中泡胀过夜。

IPG 凝胶干胶条可以在室温泡胀，也可以在电场（30V，20℃）中泡胀。泡胀液中可以含样品，也可以不含样品，对不稳定样品应采用后一种。泡胀至少需要 10 小时以上，建议在晚上进行。为防止泡胀液蒸发和尿素结晶，要在 IPG 凝胶干胶条上铺一层覆盖液（通常用硅油）。具体操作方法请参阅仪器说明书。

泡胀液的组成取决于蛋白的溶解需要。通常含有尿素、非离子或两性离子去污剂、还原剂，有时也含有 IPG 缓冲液（通常在含有样品时泡胀应加 IPG 缓冲液）。泡胀液的配制参见表 8.2。

含有 IPG 缓冲液的泡胀液是在使用前按表 8.2 所述的泡胀液中加 IPG 缓冲液，终浓度为 0.5%～2%，所用 IPG 缓冲液的 pH 范围与凝胶干胶条的 pH 范围相同或尽可能相近。载体两性电解质有时也可以代替 IPG 缓冲液。

表 8.2　不含 IPG 缓冲液的泡胀液[52, 53]

试　剂	终浓度	用量
尿素	8mol/L	12g
CHAPS	2%	0.5g
二硫苏糖醇（DTT）*	—	7mg/2.5ml
1%溴酚蓝	0.002%	50μl
双蒸水		至 25ml

注：① 根据蛋白样品溶解的需要，尿素浓度可增加至 9～9.8mol/L。
② 可用 Triton X-100、NP-40 等非离子或两性离子去污剂代替 CHAPS。
③ 为了观察干胶条的泡胀，可加溴酚蓝或橙黄 G。溴酚蓝贮液（1%）的配制：将 100mg 或适量溴酚蓝和 60mg Tris-base 溶解在 10ml 双蒸水中。
④ *二硫苏糖醇必须在使用前加入，每 2.5ml 泡胀液中加 7mg。不包括 DTT 的泡胀液配制后，应分装，在 −20℃ 保存。
⑤ 泡胀液不能加热到 37℃ 以上，因为尿素结构破坏产生的异硫氰酸盐会使蛋白质分子的氨基甲酰化。

8.2.2.3　样品制备

样品制备是影响双向电泳结果的主要因素之一。为了提高分析复杂蛋白混合物的分辨率，首先必须使感兴趣的蛋白得到充分的溶解。对可溶蛋白的样品，如血清，体液只需去除白蛋白和 IgG，再作简单处理便可直接用于双向电泳。对细胞，特别是组织，一般都需经过破碎、裂解、沉淀、溶解等多次处理才能上样。有关的处理方法请参见本章 8.3 节（实验考虑）。裂解液和样品液的组成见表 8.3。

表 8.3　裂解液[52, 53]

试　剂	终浓度	用量
尿素	8mol/L	9.6g
CHAPS	4%	0.8g
二硫苏糖醇*		400mg
载体两性电解质 pH3～10	2%	400μl
PMSF		28mg
双蒸水		至 20ml

注：① 根据蛋白样品溶解的需要，尿素浓度可增加至 9～9.8mol/L。
② 可用 Triton X-100，NP-40 等非离子或两性离子去污剂代替 CHAPS。
③ *使用前再加二硫苏糖醇。
④ 裂解液最好在使用前配置，如有多余，在 −20℃ 贮存。
⑤ PMSF 也可用其他蛋白酶抑制剂代替。

样品液与裂解液相似，但无需再加蛋白酶抑制剂。如需观察，可加少许溴酚蓝。通常要用 4 倍的样品液溶解裂解后的样品。如果样品中有较多的盐，则应用更高比例的样品液溶解。对疏水蛋白等较难溶的蛋白可用 5mol/L（或 7mol/L）尿素，2mol/L 硫脲，4%CHAPS，60mmol/L DTT，2%IPG 缓冲液（或载体两性电解质）。

2004 年在北京召开的第三届人类蛋白质组学国际会议上，Görg 题为“2D PAGE：Challenges for Proteome Analysis”的讲座中提供了以下方法供参阅，见

表8.4和表8.5。

表 8.4 裂解液和泡胀液（在凝胶泡胀的同时加样）

样品体积350μl	凝胶条长度180mm
450μl	240mm
蛋白浓度	5～10mg/ml 裂解液
裂解液	7mol/L 尿素和 2mol/L 硫脲
	4% CHAPS
	2% 载体两性电解质
	1% DTT
泡胀液	6mol/L 尿素和 2mol/L 硫脲
	1%～2% CHAPS
	1% 载体两性电解质
	0.4% DTT

注：在凝胶泡胀时，溶解在裂解液中的样品可用泡胀液等体积稀释。

表 8.5 裂解液和泡胀液（用加样杯加样，适合于碱性端窄 pH 梯度分析）

蛋白浓度	5～10mg/ml 裂解液
样品体积	20～100μl
裂解液	7mol/L 尿素和 2mol/L 硫脲
	4% CHAPS
	2%载体两性电解质
	1% DTT
	10mmol/L PMSF
泡胀液	6mol/L 尿素和 2mol/L 硫脲
	1～2% CHAPS
	1%载体两性电解质
	0.4% DTT（可用 HED 替代）

8.2.2.4 等电聚焦

固相 pH 梯度等电聚焦的加样方法有两种。一种是在干胶条泡胀时将样品加在泡胀液中，样品浓度 5～10mg/ml，样品体积 350μl（180mm 胶条），450μl（240mm 胶条）。另一种是在等电聚焦前加样品。样品可加在样品杯中，样品浓度5～10mg/ml，样品体积20～100μl，也可加在加样滤纸块上。用样品杯加样有利于碱性蛋白的分离，此时通常将样品加在阳极。具体操作请参阅仪器说明书。

固相 pH 梯度等电聚焦时电参数的设置通常采用恒功率的方式。由于 IPG 凝胶条的离子强度低，因而聚焦过程中电流很小（往往小于 1mA）。当蛋白质分子向等电点方向迁移时，电流也逐渐减小，此时为了提高分辨率，必须加大电压。如采用恒功率电源，电压便会自动上升，通常高至数千伏。凝胶条的长度、pH

范围、样品的组成、泡胀液的组成，上样方式等都会影响电压的升高，其中样品中的盐对电压升高的影响最大。电压越高，聚焦时间越短。过长的聚焦时间会导致拖尾和损失蛋白，这种现象称为“过聚焦”。

典型的等电聚焦程序有几个步骤，如在电泳槽上泡胀干胶条，所需电压很低(几十伏)。加样时也采用低电压（200～500V)，因为低电压有利于样品进入凝胶，并且能减少蛋白的聚合和相互作用。然后逐步分级升高电压，直到达到预置的电压（或伏·小时）并维持几个小时。见表8.6，表8.7和表8.8。

等电聚焦后的凝胶条可以密封在塑料袋或试管中，贮存于－80℃数月[32]。

表8.6　使用凝胶泡胀液同时加样的电泳参数

凝胶长度　180mm		最高设置电压　8000V	
温度　20℃		最高设置电流　0.05mA/每根胶条	
凝胶胞胀		30V　12～16h	
初始 IEF		200V　1h	
		500V　1h	
		1000V　1h	
IEF 到稳态		1000V→8000V	
		8000V→稳态（32 000Vh)	
1～1.5pH单位（如 IPG5～6)	8h	5～6pH单位（如 IPG4～9)	4h
3pH单位（如 IPG4～7)	4h	7pH单位（如 IPG3～10)	3h
4pH单位（如 IPG4～8)	4h	8～9pH单位（如 IPG3～12，IPG4～12)	3h

表8.7　用加样杯加样的电泳参数（IPG6～12，9～12，10～12)

凝胶长度　180mm	最高设置电压　8000V
温度　20℃	最高设置电流　0.07mA/每根胶条
加样位置	阳极
初始 IEF	150V　1h
	300V　1h
	600V　1h
IEF→稳态	600→8000V（约30min)
	8000V→稳态（32 000Vh)

表8.8　碱性蛋白（至 pH 12）的电泳参数

加样方式	加样杯/阳极
样品进入凝胶	限制低电压3h（不要过夜)
最终电压	8000V（至稳态，但不要“过聚焦”)
最大电流	0.05～0.07mA/每根胶条

8.2.2.5 pH 梯度的测定

由于 IPG 凝胶介质的导电性很低，不能用表面电极测定，如需要可用双向电泳蛋白标准在第二向电泳后测定，参见 8.3.11 节。如果是宽 pH 范围，也可以采用等电点蛋白标准在等电聚焦后测定。

8.2.2.6 平衡

由于双向电泳的第一向固相 pH 梯度等电聚焦后的样品并没有满足第二向 SDS 电泳的条件，所以聚焦后的 IPG 凝胶条需要在平衡液中平衡。平衡分二步进行，先在含有 SDS、还原剂等但不含碘乙酰胺的平衡液中平衡（振摇 10～15 分钟），以将蛋白解聚成多肽链，并包裹负电，再在含碘乙酰胺的平衡液中平衡（振摇 10～15 分钟），见表 8.9。碘乙酰胺的烷基化作用可保护 SH 基团，防止蛋白氧化，减少“纹理”（streaking）现象，得到清晰的图谱，参见 5.3.6.2 节。但平衡时间过长会丢失蛋白并使质谱分析复杂化。

平衡后用滤纸吸去多余的平衡液。将凝胶横向竖立在滤纸上，以免损失蛋白或损坏凝胶表面。

表 8.9 平衡液

试剂	终浓度	用量
1.5mol/L Tris-HCl pH8.8	50mmol/L	6.7ml
尿素	6mol/L	72.07g
甘油（87%）	30%	69ml
SDS	2%	4.0g
溴酚蓝	0.002%	400μl（1%）
双蒸水		至 200ml

注：① 第一步平衡液，在使用前加入二硫苏糖醇 100mg/10ml。
② 第二步平衡液，在使用前加入碘乙酰胺 250mg/10ml。
③ 表中贮液于 −20℃ 保存。

第二向

8.2.2.7 SDS 电泳

参照第 5 章配制合适的浓度梯度范围的 SDS 凝胶。

因为 IPG 凝胶条聚合在支持膜上，所以如果第二向仍然是水平电泳，只要将胶面朝下贴于 SDS 凝胶的浓缩胶的胶面上（阴极侧），避免气泡陷入[37]。为了提高分辨率，当溴酚蓝前沿移出凝胶条 2mm 时移去等电聚焦凝胶条，将阴极电极条移至凝胶条处后继续 SDS 电泳[53]。如果第二向是垂直电泳，要用琼脂糖将凝胶条密封在浓缩胶上。先将琼脂糖在 100℃ 融化，再待之降到 60℃ 时慢慢地将凝胶条固定，同样要避免气泡陷入。为了以后分子质量的测定，在 SDS 凝胶的一端加分子质量标准。SDS 电泳方法请参阅第 5 章。

8.2.2.8 检测

考马斯亮蓝染色、银染色、荧光标记、放射自显影等方法均可用于双向电泳的检测，参见第 4、第 5 章。

由于质谱检测对蛋白质质量的要求（5μg），所以虽然考马斯亮蓝染色的灵敏度较低，但仍然不失为双向电泳后常用的染色方法。

如果目标蛋白是低丰度蛋白，则应采用银染色，银染方法可参见第 4、第 5 章，为了与质谱分析兼容，在敏化步骤中不加戊二醛，也不需要加甲醛，当然为此灵敏度有所降低，但也可检测到 5ng 的蛋白[54]。

锌-咪唑负染法检测极限为 15ng[55]，与质谱兼容性好，但定量不准确。

放射自显影和荧光成像是非常灵敏的检测方法，可低至 200fg[52]。为了进行放射自显影检测，可用同位素标记，一般使用^{35}S、^{14}C、^{3}H和^{32}P。电泳后凝胶简单干燥，然后在 X 射线胶片或磷屏下曝光。荧光成像极其灵敏，凝胶电泳后与 PPO（2,4-diphenyloxazole）结合再检测。

使用荧光染料如 SYPRO、deep purple、Cydye 等进行荧光标记来检测不但灵敏度高，而且没有放射性，是当前最佳检测方法。特别是使用 Cydye 进行荧光差异分析简化了染色程序，并且提高了灵敏度、准确性和重复性，与质谱兼容性好，定量动力学范围宽。缺点是花费大，需要荧光扫描仪。有关方法参见本章 8.3.14 节和 8.3.15 节。

双向电泳后也可以转移到硝化纤维素膜或 PVDF 膜上以进行免疫化学检测或序列测定。

理论上，一块双向电泳凝胶能分离出多达 15 000 个蛋白斑点[52]，实际上，到目前为止最多可得到 11 000 个蛋白斑点[1]。大多数实验室到目前为止只能分离出几千个蛋白斑点。纵然如此，想用肉眼来比较双向电泳凝胶之间蛋白斑点的差异（新出现的斑点、斑点消失、位置变化、量的变化等）是不可能的。所以必须通过图像扫描，存储为图像文件进行分析。扫描时应选择合适的分辨率，大多数情况下 300dpi（dot per inch）比较合适。相对于凝胶而言，缩小的图像会导致图像质量的损失或无法分辨；而放大的图像则会由于多余的像素而出现内插值（interpolated values），甚至会出现“像素效应”（pixellation），影响测定。因此扫描时图像与凝胶大小最好是 1∶1，如果是考马斯亮蓝或银染色，采用灰度透射模式扫描[56]。

图像分析软件用于评价和量化电泳结果[57]。在蛋白质组学研究中，图像分析既要对上游各步的结果做出定性和定量的评价，将一个直观的蛋白质双向图谱数字化，还要为下一步的分析提供依据。特别是在比较研究中，需要用图像分析软件通过对正常和异常细胞、组织等的电泳图谱间的匹配，找出差异蛋白点，再结合图像分析数据与内部和外部数据库比较的结果做出结论。由此可见，双向电

泳图像分析在蛋白质组学研究中是不可或缺的。

现在各大公司都有 2-DE 图像分析软件可供选择，如 Gellab-Ⅱ、Kepler、BioImage、Melanie、PDQuest、ImageMaster 2D Elite 等，自动化程度更高的 Z3 和 Progenesis 也已推出。图像分析软件虽然界面、算法和功能各异，但是过程大致相同，包括点检测、背景消减、匹配、分子质量与等电点校正、数据标准化等。

8.2.2.9 蛋白斑点的后续分析

如果需要对图像分析后感兴趣的蛋白质进一步分析，首先要将这些蛋白斑点用人工或自动化仪器提取，然后进行酶解。请参见第 3 章所示的各种仪器。现在有 4 种酶解方法将蛋白切成肽段[58]：

(1) 凝胶内酶切 (in gel Digestion)；

(2) 电洗脱后在溶液中酶切 (electroelution and digestion in solution)；

(3) 电转移到膜上后在膜上酶切 (electrotransfer onto a membrane and cleavage on the membrane)；

(4) 在印迹过程中酶切 (digestion during blotting)。

酶解后可以用基体辅助激光解析电离飞行时间质谱 (Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time of Flight Mass Spectrometry，MALDI-TOF-MS) 测定凝胶内酶切后多肽混合物的质量，获得肽质量指纹图谱 (Peptide mass fingerprinting，PMF)。这一方法中用质谱分析的是蛋白质被酶切后的多肽混合物，而不是分析蛋白质本身，因为电泳后凝胶上的蛋白质很难从凝胶上洗脱下来进行质谱分析，而且仅用蛋白质的分子质量在数据库内检索鉴别是很不充分的。与之相反，多肽容易从凝胶上洗脱下来，而且一个蛋白质被酶切后生成的一小组多肽的质量，能提供足够的信息在数据库检索鉴定。近年来的研究进展显示，从凝胶上切下数百个蛋白质的斑点，进行凝胶内酶切，用 MADLI-TOF-MS 测定 PMF，到最后数据检索鉴定的整个过程，可以实现自动化，进行高通量的蛋白质组学研究。[58~60]。

蛋白质组学研究经典方法的步骤见图 8.6。



图 8.6 2-DE/MS：蛋白质组学研究的经典方法

8.3 实验考虑

8.3.1 双向电泳的次序

在大部分双向电泳中均采用等电聚焦作为第一向，SDS 电泳作为第二向，但是也有采用相反的次序[61~63]。利用 SDS 电泳作为第一向的优点是克服了蛋白质的溶解问题，但缺点是：

1）SDS 电泳后凝胶中的盐离子并不均匀分布而使等电聚焦时的电场强度发生改变[64]；

2）由于 SDS 的存在，对碱性蛋白的等电聚焦可能是个严重的问题[65]；

3）虽然梯度 SDS 电泳有很高的分辨率，但等电聚焦是使用非限制性凝胶，孔径较大，结果使蛋白分子在等电聚焦时扩散，造成斑点增大而影响分辨率，这是最大的缺点[64]。

8.3.2 非平衡 pH 梯度电泳（NEPHGE）

O'Farrell P.H[6]的双向电泳主要解决了 pH4～7 的蛋白质分离。为了克服平衡 pH 梯度电泳时的严重阴极漂移和碱性蛋白的丢失。O'Farrell P.Z 等[66]采用非平衡 pH 梯度电泳（nonequilibrium pH gradient electrophoresis，NEPHGE）作为双向电泳的第一向。在 NEPHGE 中，蛋白被加在 pH7～10 或 pH3.5～10 的凝胶的酸性部分，电泳时间相对比较短（决定于蛋白的特性）。NEPHGE 的重复性与载体两性电解质、聚焦时间、凝胶长度和样品的组成有关，故在进行比较实验时应采用相同的实验条件。虽然在电泳过程中，酸性蛋白迁移速率的减慢比碱性蛋白快，分辨率不如后者，但能辨别细小的差别[66]。为了得到可靠的结果，最好同时进行平衡和非平衡电泳的比较。对有些样品来说，NEPHGE 的分离效果并不理想[67]。即使是碱性蛋白，有时用平衡电泳方法也能得到比非平衡方法更好的分辨率和重复性[68]。非平衡电泳系统的缺点是电荷分离并不是惟一因素，两种分离参数是相互影响的[34]。重要的是通过平衡和非平衡方法能分辨不同形式的电荷突变[69]。

8.3.3 管状、垂直与水平方式的比较

传统的 ISO-DALT 系统是用管状凝胶进行第一向等电聚焦，再用垂直平板方式进行第二向电泳[16,19,66]，以后，第二向也有使用水平方式的[37]。现在的 IPG-DALT 系统是用凝胶条在水平方向等电聚焦，然后再在垂直或水平方向进行

SDS 电泳[27~29,32,70]，见图 8.7。

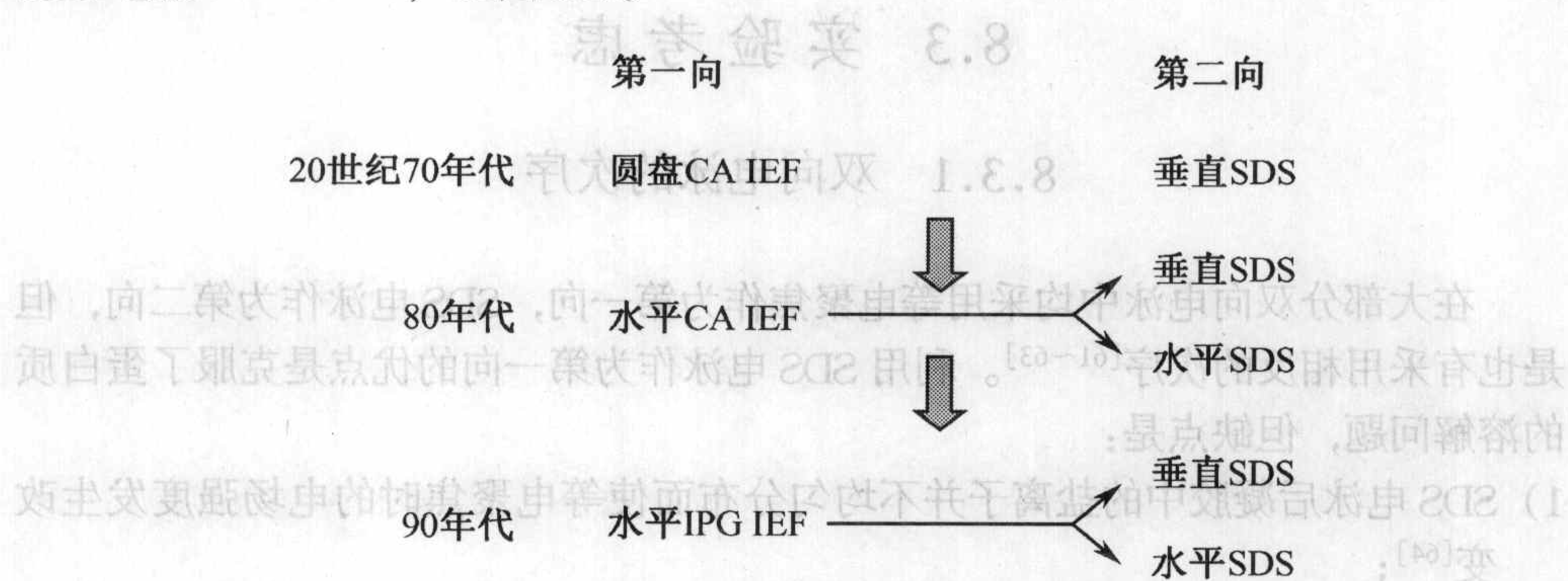


图 8.7　双向电泳的方式

Görg[70]在 1985 年的综述中认为垂直与水平方式的双向电泳在分辨率、点的大小和分布方面均没有明显区别，只是在操作上后者明显地简便。但她在 1995 年的综述[32]中则用图表示水平电泳在分辨率、点的大小和分布方面都明显的优于垂直电泳（见图 8.8 和 8.9）。

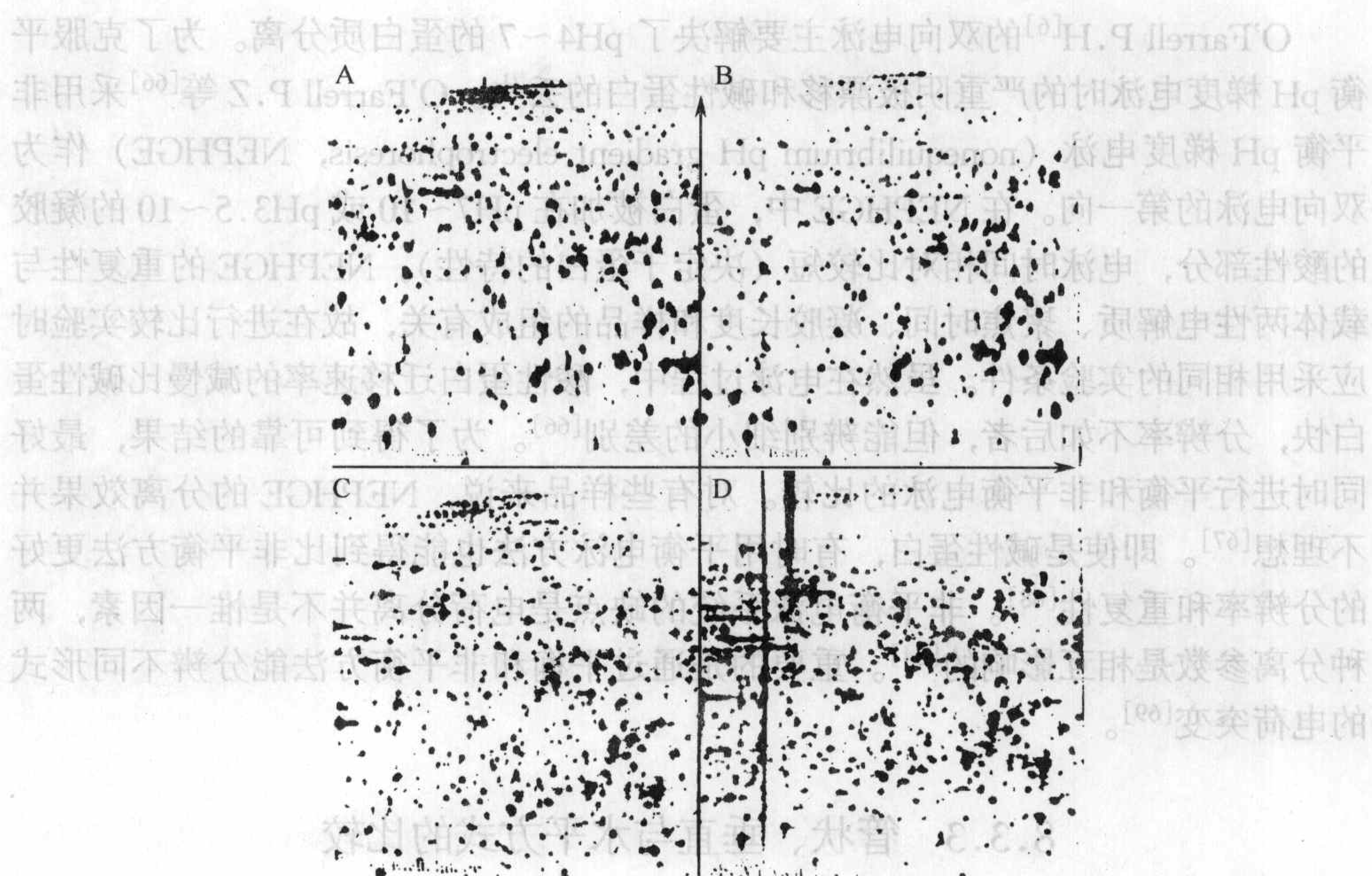


图 8.8　鼠肝蛋白的双向电泳图谱[32]第一向，IPG IEF4～9，第二向（A、B）垂直电泳（C、D）水平电泳

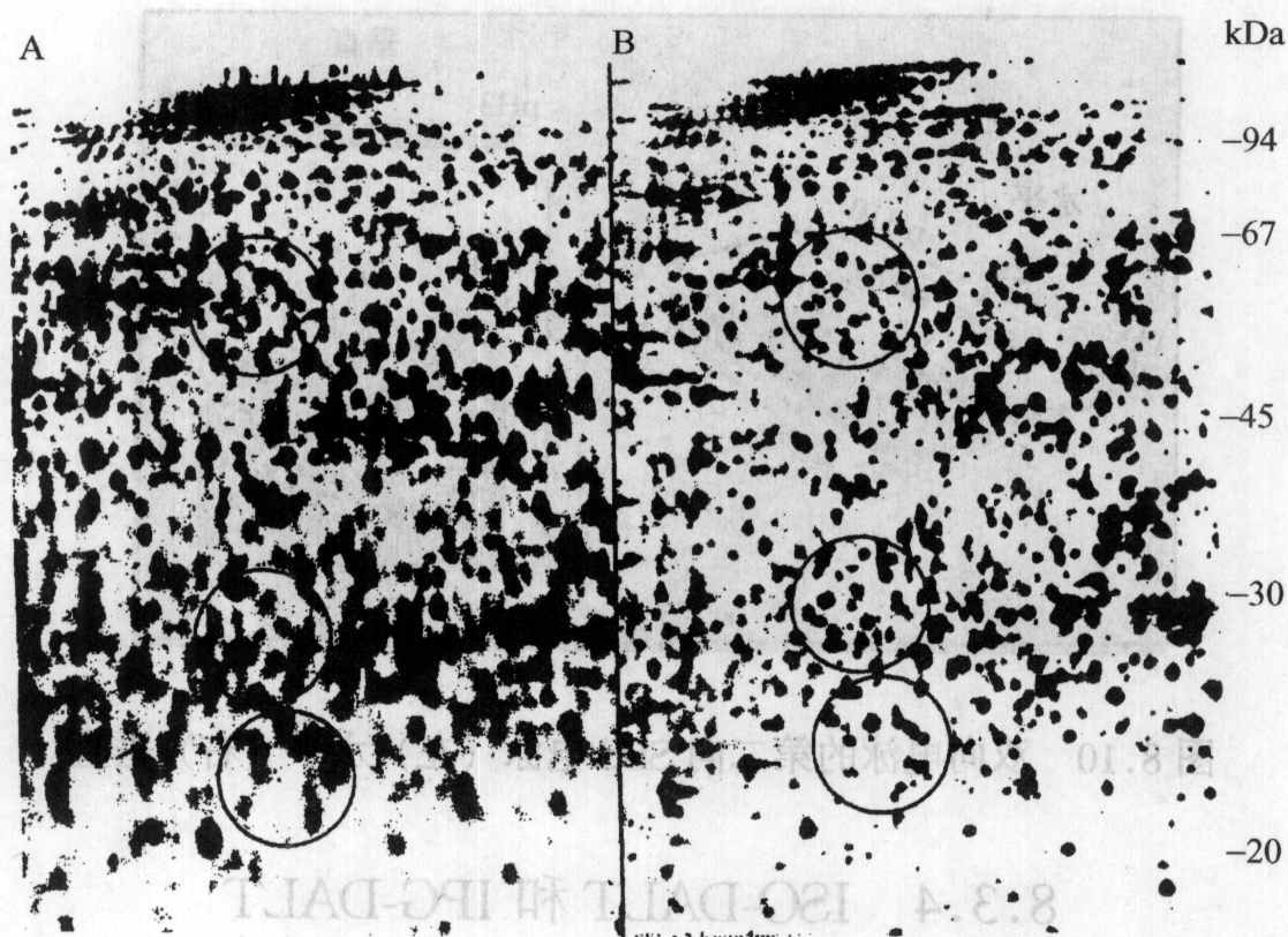


图 8.9　鼠肝蛋白的双向电泳[30]

(A) 垂直 IPG-DALT；　(B) IPG-DALT

随着电泳技术的改进，水平电泳用的凝胶聚合在支持膜上，使得两块凝胶间有最佳的胶面接触，不需要修改凝胶的大小和边缘，更不需要用琼脂糖埋胶，操作极为简便。且由于凝胶固定在支持膜上，转移时没有尺寸的改变，增加了沿双向电泳图的 X 轴的点分布的重复性。染色和脱色时不会使凝胶变形，从而保证了比较实验的重复性。但是随着 T 值的增加，SDS 小孔梯度胶易发生肿胀，并在染色时会见到点的纹理（streaking）现象。为了克服这种现象，可将支持膜在水中漂洗 30 分钟或增加凝胶厚度[70]。

IPG-DALT 方法的第一向通常用凝胶条在水平电泳上进行。由于 IPG 技术本身 pH 梯度的稳定性以及凝胶固定在支持膜上，因而不但操作方便，而且重复性好。第二向水平电泳使用薄层凝胶和半干技术[71,72]，使操作大大简化，而且可以缩短电泳时间和提高分辨率，见图 8.10（左）。

尽管采用水平电泳作为第二向可以得到高分辨率（胶层薄，冷却好，可以加高电压），操作也很方便（有支持膜，可用半干技术），但是 SDS 水平电泳后分离的蛋白斑点的量不足以用于质谱分析。此时，应该用垂直电泳作为第二向，见图 8.10（右）。因为垂直电泳可以用较厚的胶（如 2mm），并且一次可以同时电泳 2 块、6 块甚至 12 块胶，这样就可以得到足够的蛋白质用于后续的质谱分析，所以目前蛋白质组学研究中，双向电泳的第二向通常采用垂直方式。

Sarmiento[73]用一次性微量移液管和实验室装置进行蛋白质双向电泳，得到了满意的分辨和重复性。

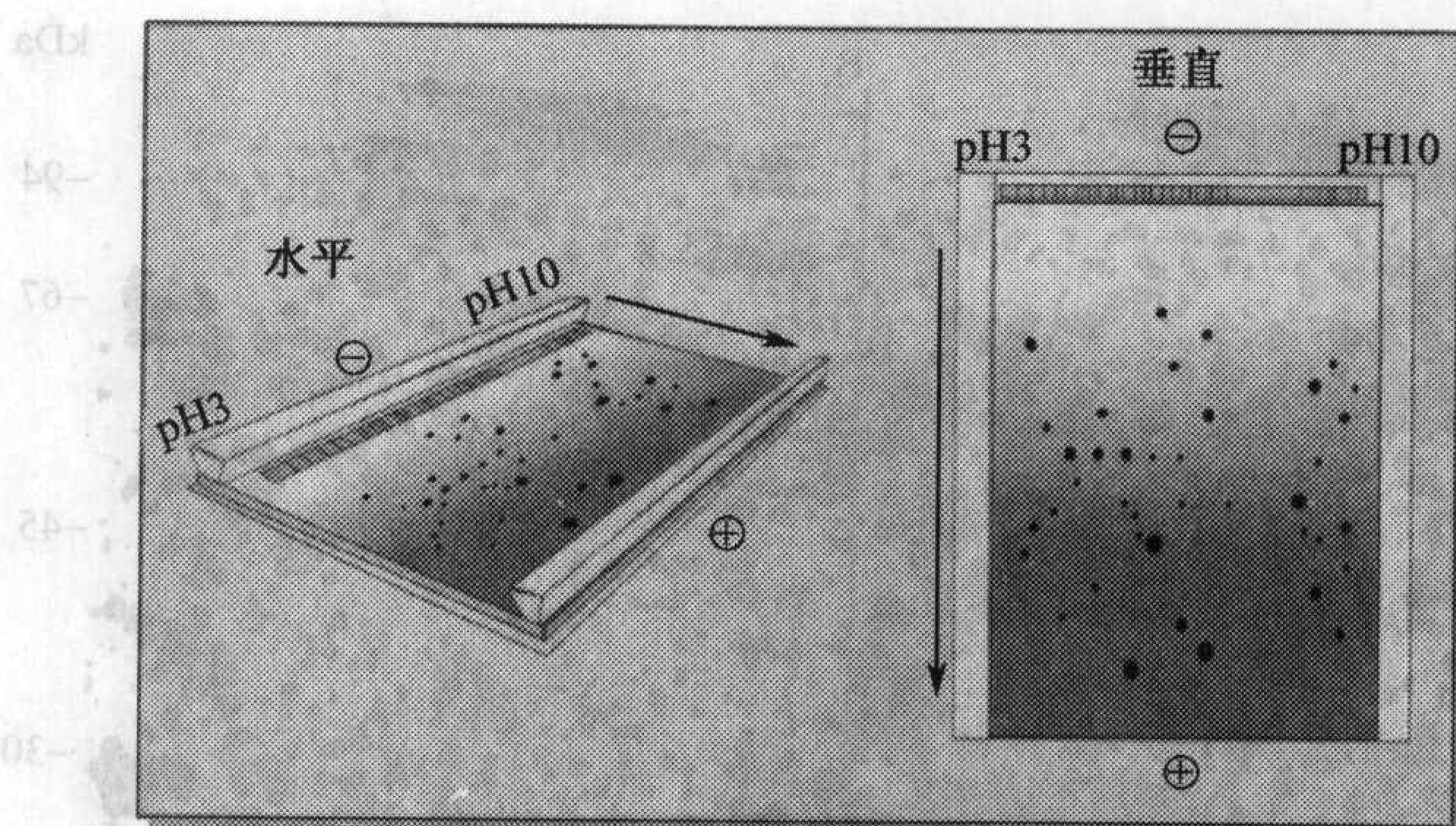


图 8.10　双向电泳的第二向 SDS 电泳（左）水平（右）垂直

8.3.4　ISO-DALT 和 IPG-DALT

1975 年 O'Farrell[6]和 Klose[16]分别报道了高分辨的 ISO-DALT 双向电泳后，科学家们一直致力于解决方法的稳定性、重复性、分辨率和酸、碱性蛋白的分析，并发展了非平衡 pH 梯度电泳[66]。Klose[1]撰文阐述了 ISO-DALT 方法的改进和发展，而且得到了鼠组织的一万个点的双向图谱，照片十分清晰。但是，现在 ISO-DALT 仍然不被实验室广泛应用，这是因为：1）分辨率不及 IPG IEF；2）不同批次的载体两性电解质重复性差；3）梯度不稳定；4）梯度漂移导致重复性差和碱性蛋白丢失；5）凝胶孔径的稳定性较差；6）个人操作技术影响结果。

80 年代后期，Görg 等[27~29, 32, 37, 70]将固相 pH 梯度等电聚焦技术用作双向电泳的第一向，称为 IPG-DALT。固相 pH 梯度等电聚焦作第一向的优点是：1）上样量大；2）可以分离酸性和碱性蛋白；3）凝胶的机械性能和孔径稳定；4）离子型杂质的干扰很少；5）DTT 可以通过再水化引入；6）使用平衡的方法，没有梯度漂移；7）pH 梯度的宽度和斜率可以自由选择；8）使用商品化的预制 IPG 干胶条，提高重复性；9）易于操作，易于标记以进行样品追踪。这是目前流行的双向电泳方法。Görg 等[28, 70, 75, 76]用此方法将同一样品在自己实验室内，甚至在国际上不同实验室进行比较。结果发现重复性很好，相关系数不小于 0.9994，解决了 ISO-DALT 的致命缺点。但是在等电聚焦凝胶上的蛋白向 SDS 凝胶转移时，在两块胶的接触区域会发生电内渗[76]，使胶发黏，阻碍了蛋白的转移，这是由于在电泳时，碱性环境中固相 pH 梯度凝胶的固相缓冲基团（如 COO^-）发生离子化，在两块胶的接触区域内形成结合水流向 SDS 胶的阴极。在 SDS 电泳时，等电聚焦凝胶在阳极收缩，在阴极肿胀，凝胶发黏，使蛋白质从第一向到第二向的转移不完全，由三恒电源上电流的减小和电场强度的增加可以得到证明，而且最后在双向图谱上呈现水平纹理现象。为了尽可能减轻电内渗现象，可降低

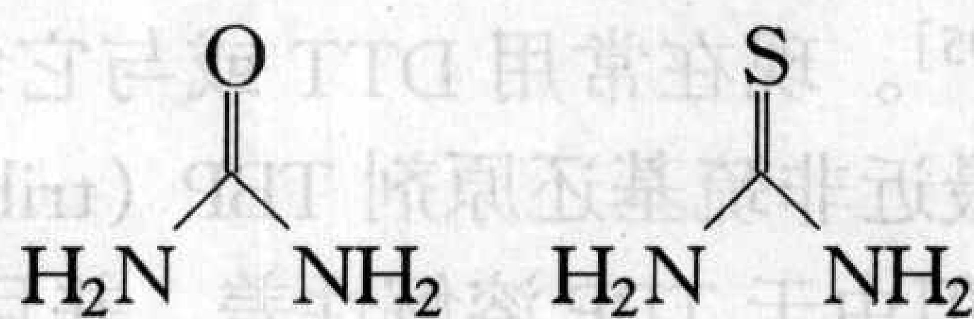
等电聚焦凝胶中 Immobiline 的浓度，但这会影响 pH 梯度的稳定性。将凝胶条的宽度缩小到 5mm，甚至 3mm[28]。在平衡液中加入 6mol/L 尿素和 30%（*W*/*V*）甘油，平衡两次，每次 15 分钟。采用 Laying-on 技术将第一向胶条放置在 SDS 胶上[28,70]。

8.3.5 用一个省时、省材料的技术路线起始双向电泳实验

以固相 pH 梯度等电聚焦为第一向的双向电泳是当前分辨率最高，信息量最大，但也是花费最大，需时最长，并且技术难度最大的电泳技术。通常初始实验者可能要练习几十个全过程才能得到几千个蛋白斑点。而现在每个全过程差不多需要一周的时间。这不但浪费很多宝贵时间，而且也浪费很多实验材料。上世纪 90 年代初，作者从瑞典学习了这一先进技术，回国后经历了上百次的失败，但由此得到了一个摸索实验的技术路线：初始实验者应先掌握好第二向 SDS 电泳及染色技术，然后再从第一向按程序做。这样既可节省经费材料又节约时间。因为 SDS 电泳是电泳中最易掌握，花费最少的电泳技术，而固相 pH 梯度等电聚焦是花费最大，时间最长，难度最大的技术。如果按常规程序从第一向开始摸索实验，如果结果不理想，很难分析问题出在哪一步？如果先将省时、省材料、易学的 SDS 电泳和染色技术过了关，那么就容易找出双向电泳的问题所在，是样品制备？（注意：变性等电聚焦与 SDS 电泳的样品要求有别）等电聚焦？还是平衡？作者成功的将这个技术路线用在 1998 年与中国军事医学科学院放射医学研究所和医学分析测试中心[77,78]以及随后的基础医学研究所等单位的合作中[3,79,80]，为他们的蛋白质组学研究课题迈开了第一步。尽管这只是一个技术路线，但它为尽早叩开我国蛋白质组学研究大门做出了一点小小的奉献，就像 Lee[81]所说“蛋白质组学是由技术启动，但又受技术制约的探索性科学”。离开了技术，就不会有生命科学的科技成果。

8.3.6 变性剂、去污剂和还原剂

蛋白质样品的充分解聚并完全溶解是提高双向电泳分辨率的关键因素。为此，科学家们正努力寻找合适的变性剂、去污剂、还原剂等以达到尽可能提高蛋白质溶解度的目的。通常在泡胀液、裂解液、样品液、平衡液中都会有这些组分[79,80,82,83]。



尿素　　　硫脲

尿素常被作为双向电泳的变性剂，它是一种中性促溶剂。它通过展开蛋白质分子，暴露疏水基团，降低疏水氨基酸残基与溶液结合的能障，从而增加样品的溶解度。通常使用的浓度为 8mol/L，但为了有些蛋白质溶解的需要，尿素的浓度往往可增加到 9mol/L 或 9.8mol/L（但只有高质量的尿素，才能达到这么高的浓度）。近年来，科学家发现硫脲（thiourea）能进一步改善蛋白质的溶解性[80,83~87]，尤其是对膜蛋白。硫脲也是一种高效的离液剂（chaotropes），不易溶于水，但溶于高浓度的尿素。故一般将 2mol/L 硫脲溶于 5～7mol/L 的尿素中[86]。Pasquali 等[86]报道：加硫脲可溶解 E-cadherin、caveolin 等穿膜蛋白，获得带有更多蛋白斑点的清晰双向电泳图谱。含有尿素的溶液应在 10～37℃ 中操作，因为低于 10℃，尿素会从溶液中析出，高于 37℃ 时，尿素中的氰酸盐会引起蛋白质的氨基甲酸化。

为了促使样品溶解和防止由于疏水反应引起蛋白质的聚合，在双向电泳使用的各种溶液中都含有非离子或两性离子去污剂，过去常使用两种相似的非离子去污剂 NP-40 和 Triton X-100[53,58]。后来研究证明，两性离子去污剂 CHAPS 的效果更好[89]。通常使用去污剂的浓度为 0.5%～4%。有一些新的去污剂如 CHAPSO，Triton X-114，Tween 80，C6BZ，CTAB，SB 3-10，SB 3-12 等可提高膜蛋白的溶解性[80,90,91]。SB 3-10 比 CHAPS 更有效，但难溶于高浓度尿素（在大于 5mol/L 尿素中不溶）Rabilloud[87,90]建议使用 5mol/L 尿素、2mol/L 硫脲、2% CHAPS 和 2%SB 3-10 作为样品溶液。

对于难溶解的样品，阴离子去污剂 SDS 是一种相当有效的蛋白质促溶剂。但由于它会与蛋白质形成复合物并且带负电，所以不能在第一向中单独作为去污剂使用。有报道先在样品制备中使用 SDS，后用非离子或两性离子去污剂稀释，如用 Triton X-100，NP-40 或 CHAPS 溶液稀释，使 SDS 的终浓度降低到 0.25% 以下，非离子或两性离子去污剂和 SDS 的比例至少为 8:1[92~94]。实际上，由于上样量的限制，这个方法对于低丰度蛋白的分析是不现实的。

第一向凝胶和样品中过量的去污剂会严重影响双向谱型[28]。为了减少过量的去污剂从等电聚焦凝胶转移到 SDS 凝胶中，可以采取三种方法：① 减小等电聚焦凝胶条的宽度；② 等电聚焦后，平衡前从胶条中洗去去污剂；③ 减少第一向凝胶条中去污剂的浓度，如将 NP-40 的浓度从 2%减少到 0.5%，就能得到较好的复杂蛋白混合物的双向谱型[28]。

为了断开二硫键，使蛋白质处于还原状态，在各种溶液中需加入还原剂。过去常用 β-巯基乙醇作还原剂，但需要较高的浓度（4%～5%），所以内含的杂质和其强挥发性会干扰分析[95]。现在常用 DTT 或与它结构性能相近的 DTE，使用浓度 20～100mmol/L。最近非巯基还原剂 TBP（tributylphosphine）也被使用，使用浓度为 2mmol/L[96]，但由于 TBP 溶解性差，并且在溶液中不稳定，故应在使用前加入，并且不要用作第一向电泳所用溶液的还原剂。

在第一向所用的各种溶液中还常常含有载体两性电解质或 IPG 缓冲液（实际上它的主要成分就是载体两性电解质）。其 pH 范围与凝胶条的范围相应。如 7.4.4 节中所述，由于载体两性电解质起屏蔽分子的作用，遮挡了蛋白质分子表面的巯水基团，明显地增加了蛋白质分子的溶解度。同时由于载体两性电解质的导电性高于固相 pH 梯度凝胶，使载体两性电解质/固相 pH 梯度凝胶的电泳时间明显缩短，这种“杂交等电聚焦技术”(hybrid isoelectric focusing)[70]由 Görg[27,29]成功地引入双向电泳的第一向中。

8.3.7 样品的处理

样品制备是双向电泳的关键技术，也是最困难的技术。因为不像双向电泳的其他过程有仪器，有大致相似的操作程序，而样品由于其结构特性各异，又必须使其完全溶解和尽可能少的化学修饰，所以不可能有一个通用的配方，只能通过大量实验来积累经验。

制备样品时，首先要明确最终需要的结果。是分离尽可能多的蛋白质还是分离样品中某些感兴趣的蛋白质？从而确定制备方法。欲分离的蛋白必须是完全溶解的。溶解的效果取决于裂解、破碎、沉淀、溶解的过程以及去污剂的选择和各种溶液的组成。如果只对样品中的一部分蛋白质感兴趣，可采取预分离的方法，如欲分析的蛋白质来源于细胞器（细胞核、线粒体、原生质膜），则应先采取超速离心或其他方法将细胞器分离出来再溶解蛋白质。对样品进行预分离能提高最终结果的质量，但也会造成一些蛋白质的丢失。

8.3.7.1 破碎[97]

为了对样品中的蛋白质作完全分析，首先必须对组织或细胞进行有效地破碎。破碎方法的选择取决于样品的来源，易碎的细胞还是坚硬组织？细胞破碎的方法必须以最小限度地减少蛋白质水解和其他形式的蛋白质降解为原则。破碎应在低温中进行，并减少破碎过程中热量的产生，为此可将预冷的样品放在冰块上或液氮中。细胞破碎过程中有可能释放蛋白酶，使蛋白质水解，所以破碎应当直接在含有蛋白酶抑制剂的裂解液中进行，使蛋白水解酶迅速失活，也可抑制其他一些修饰蛋白酶的反应。

如果样品是易于裂解的细胞，可以用温和的裂解细胞的方法来破碎样品[97]。破碎方法有以下几种：

(1) *渗透法*

适用于血细胞和组织培养细胞。这是一种非常温和的方法。只要将样品置于低渗透液中，就可将样品破碎成亚细胞成分。

(2) 冻融法

适用于细菌和组织培养细胞。可利用液氮一次或反复多次将细胞迅速冻融的方法来裂解。

(3) 去污剂法

适用于组织培养细胞。将样品悬浮在含有去污剂的裂解液中，去污剂能溶解细胞膜并释放内含物。如果裂解液中有 SDS，为了不干扰等电聚焦，可将裂解的样品用含有过量的非离子或两性离子去污剂的溶液稀释，或用丙酮沉淀法从样品中除去 SDS。

(4) 酶裂解法

适用于植物组织、细菌和真菌细胞，在等渗溶液中用合适的酶处理细胞，如溶菌酶适于细菌细胞，纤维素酶和果胶酶适于植物细胞。酶降解法可以裂解细胞壁，释放内含物。

当细胞不太容易破碎时，如硬组织细胞或具有坚硬细胞壁的细胞，可使用剧烈的裂解方法，但要避免破碎时产生热量和泡沫[97]。

(5) 超声波法[28,98,99]

适用于细胞悬浮液。通过超声波发生器产生的超声波破碎细胞，破碎的强度与超声波的振幅成正比。为避免破碎过程中产生热量和泡沫，可采用短时间冲击细胞悬浮液并在冲击间隙将样品放在冰上冷却。

(6) 高压法[92,100,101]

适用于有细胞壁的微生物。将细胞悬浮液放入预冷的压力室中，通过小孔对细胞的压力破碎细胞。

(7) 研磨法[78,32,102,103]

适用于微生物和组织。将样品用液氮冷冻，并将它们放在加有氧化铝细沙的研钵中用手工研磨成细粉末。

(8) 匀浆法[104~108]

适用于组织。先将组织切碎，在匀浆器（如 Dounce 和 Polfer Elvehjem）中加入相当于组织 5~20 倍预冷的匀浆缓冲液，快速破碎，用离心或过滤的方法收集裂解物。如果需要处理大量样品，可使用搅拌器或其他电动装置。

(9) 玻璃珠破碎法[100,101,109]

适用于细胞悬浮液和微生物。这是利用玻璃珠的摩擦作用破坏细胞壁，并释放细胞内含物。先将细胞悬浮在等体积预冷的裂解液中，再加入 1~3 倍预冷的玻璃珠。旋转一分钟，在冰上冷却一分钟，重复 2~4 次。

GE 医疗集团，安玛西亚公司有专门用于破碎细胞的附件，称为“Sample Grinding Kit”，见图 8.11。

8.3.7.2 防止蛋白质水解[97]

当细胞被破碎后，蛋白质水解酶就被释放出来或被激活。伴随着蛋白质被水

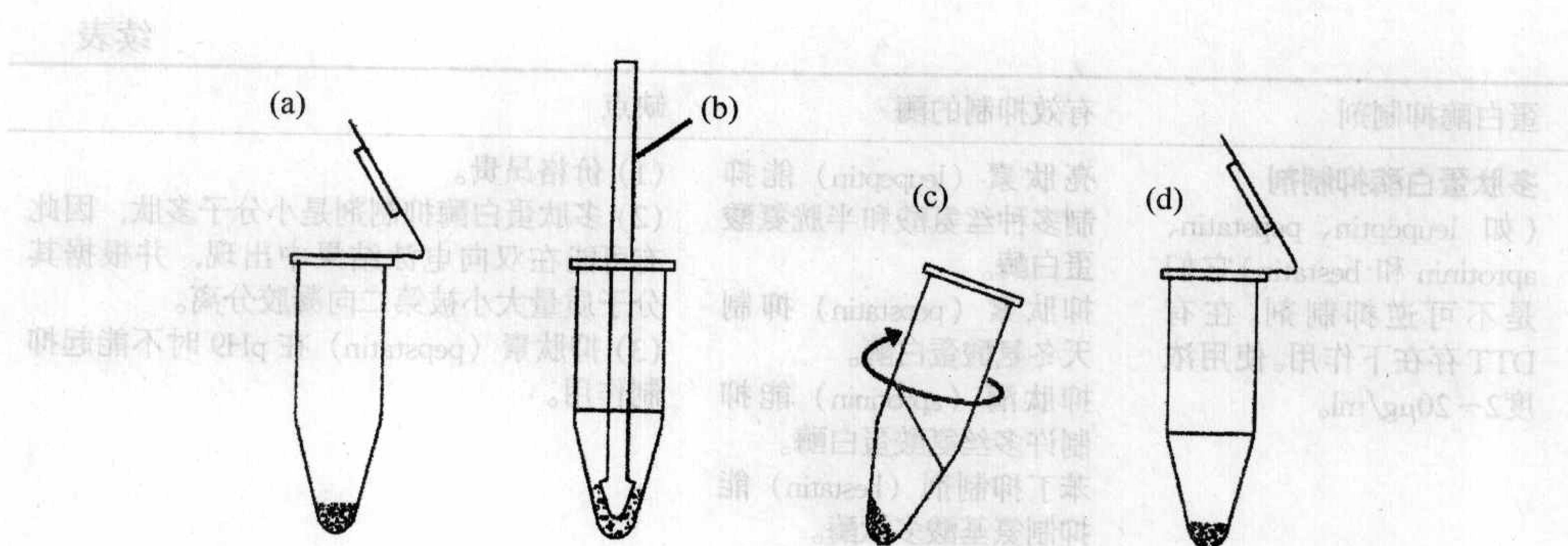


图 8.11　细胞破碎

(a) 在小离心管中加入研磨树脂；(b) 加入样品和裂解液，使用研磨杵破碎样品；(c) 离心沉淀细胞碎片和树脂；(d) 收集上清液

解，使双向电泳结果复杂化，为此可直接将样品变性，如用 8mol/L 尿素、10％ TCA 或 2％SDS[93,110～113]来抑制蛋白酶。在低温的时候，蛋白酶的活性低，因此建议在样品制备时尽可能在低温下进行。此外，许多蛋白酶在 pH 9 以上就失活了，因此 Tris 碱，碳酸钠或碱性载体两性电解质往往能抑制蛋白质水解。但是有些蛋白酶在上述条件下仍然保持着活性，此时应当使用蛋白酶抑制剂。每一种蛋白酶抑制剂只对某一类蛋白酶起作用，因此建议复合使用蛋白酶抑制剂，如广谱蛋白酶抑制剂“鸡尾酒”。表 8.10 提供了常用的蛋白酶抑制剂及被抑制的酶[97,102,111～114]。

表 8.10　蛋白酶抑制剂

蛋白酶抑制剂	有效抑制的酶	缺点
PMSF （Pheylmethylsulfonyl fluoride）是很常用的抑制剂，使用浓度为 1mmol/L。	不可逆抑制丝氨酸水解酶和一些半胱氨酸水解酶。	(1) PMSF 在水溶液中很快失活，需在使用前现配。 (2) PMSF 在含有巯基试剂（DTT 或 β-巯基乙醇）时效果不好。此时可将样品先加在含有 PMSF 而无巯基试剂的溶液中，然后再加巯基试剂。 (3) PMSF 毒性相当大。
AEBSF 丝氨酸抑制剂（Aminoethyl benzylsulfonyl fluoride 或 Pefabloc SC）使用浓度为 4mmol/L。	AEBSF 的抑制活性与 PMSF 相近，但它更易溶于水而且毒性低。	AEBSF 具有修饰能力，会改变蛋白的 pI 值。
EDTA，EGTA 使用浓度 1mmol/L。	通过螯合蛋白酶维持活性所必需的金属离子来抑制金属蛋白酶。	

续表

蛋白酶抑制剂	有效抑制的酶	缺点
多肽蛋白酶抑制剂 (如 leupeptin、pepstatin、aprotinin 和 bestatin)它们是不可逆抑制剂。在有DTT存在下作用。使用浓度2～20μg/ml。	亮肽素(leupeptin)能抑制多种丝氨酸和半胱氨酸蛋白酶。 抑肽素(pepstatin)抑制天冬氨酸蛋白酶。 抑肽酶(aprotinin)能抑制许多丝氨酸蛋白酶。 苯丁抑制剂(bestatin)能抑制氨基酸多肽酶。	(1) 价格昂贵。 (2) 多肽蛋白酶抑制剂是小分子多肽，因此有可能在双向电泳结果中出现，并根据其分子质量大小被第二向凝胶分离。 (3) 抑肽素(pepstatin)在 pH9 时不能起抑制作用。
TLCK, TPCK (Tosyl lysine chlorometly ketone, tosyl phenylalanine chloromethyl ketone)使用浓度0.1～0.5mmol/L	不可逆的抑制丝氨酸和半胱氨酸的蛋白酶。	
苄脒(Benzamidine) 使用浓度 1～3mmol/L。	抑制丝氨酸蛋白酶	

GE 医疗集团，安玛西亚公司推出一种复合蛋白酶抑制剂，它包括竞争和非竞争蛋白酶抑制剂，可有效的抑制 95%以上的蛋白酶活性。

8.3.7.3 沉淀蛋白[97]

为了从复杂的蛋白质混合物中去除杂质（如盐、去污剂、核酸、脂类等），有选择性地分离蛋白质，可采用沉淀方法。但有些蛋白质沉淀后不能重新溶解，并且使用沉淀方法有可能改变样品中蛋白质的成分。如果想要完全和准确地得到样品中的蛋白质，最好避免使用沉淀和重溶的方法。一般在样品处理中只使用下述其中一种蛋白质沉淀方法[97,115]。

(1) 硫酸铵沉液法

在高盐浓度的缓冲液中蛋白质会聚合并沉淀，由此可进行预分离和蛋白质富集，但不能得到全部蛋白质，并且残留的硫酸铵和污染物（如核酸）会影响等电聚焦，必须除去。方法参见 8.3.7.4 节。

该方法是在蛋白终浓度大于 1mg/mL 并含有 EDTA 的缓冲液（>50mmol/L）中慢慢地将硫酸铵加至需要的饱和度，搅拌 10～30 分钟，再离心分离。

(2) 三氯醋酸（TCA）沉淀法

TCA 是一种很有效的沉淀剂。但被沉淀的蛋白质很难再溶，甚至不溶。并且长时间的将样品置于这种低 pH 溶液中，会引起蛋白质的降解和修饰。

在蛋白溶液中加 TCA，使其终浓度为 10%～20%，在冰浴中沉淀 30 分钟[116]，也可直接将组织放在 10%～20%的 TCA 中破碎，后者可抑制蛋白质水

解和其他蛋白质修饰。残留的 TCA 可用丙酮或乙醇洗去。

(3) 丙酮沉淀法

在蛋白质溶液中加入 3 倍体积的预冷丙酮，20℃，沉淀 2 小时，离心收集蛋白质沉淀。通过空气干燥或冷冻干燥除去残留的丙酮。

(4) TCA-丙酮沉淀法

这是双向电泳制备样品常用的方法，比单独使用 TCA 或丙酮效果好，但也同样存在上述两种方法的问题。

该方法是用含 20mmol/L DTT 或 0.07% β-巯基乙醇的 10% TCA 溶液在 20℃沉淀至少 45 分钟，离心收集蛋白质沉淀，再用预冷的 20mmol/L DTT 0.07% β-巯基丙酮溶液清洗。再用空气干燥或冷冻干燥除去残留的丙酮[28, 93, 102, 117～119]。

(5) 醋酸铵沉淀法

用醋酸铵的甲醇溶液沉淀蛋白质，再用酚抽提，适合于含有大量干扰物质的植物样品，但该方法繁杂费时。样品中的蛋白能被抽提进入水或缓冲液饱和的酚中，从酚相中再用含有 0.1mol/L 醋酸铵的甲醇溶液清洗沉淀数次，然后用丙酮清洗，再蒸发残留的丙酮。

8.3.7.4 清除污染物[97]

样品中的非蛋白杂质会影响双向电泳的结果，因此，在样品制备时应设法除去。样品中的污染物及清除方法如下[82, 97]。

(1) 盐和外源带电小分子的清除

样品中的盐会增加凝胶条的电导，使无法达到设置的电压，从而影响蛋白质聚焦。这些带电小分子还能引起水的流动，使胶条的一端肿胀而另一端变干，最终使两端的酸、碱性蛋白质无法聚焦，造成拖尾或丢失。所以在样品中的盐离子浓度应尽可能低。如在凝胶条泡胀时同时加样，盐浓度应低于 10mmol/L，如在样品杯中加样，盐浓度应低于 50mmol/L。但是由于样品杯中的蛋白质会迅速向低盐浓度方向迁移，所以在加样处的蛋白质可能发生沉淀。除盐的方法很多。透析是常用的有效方法。损失样品少，但样品被稀释，需要过夜。旋转透析速度快，但透析膜会吸附蛋白质，造成蛋白质丢失。尿素和去污剂应该在旋转透析后再加。GE 医疗集团、安玛西亚公司有一个微量透析附件“Mini Dialysis Kit”，每次可透析 250μl 或 2ml，使用此较方便，见图 8.12。

凝胶过滤虽然有时会丢失蛋白质，但不失为快而有效的方法。可使用 GE 医疗集团、安玛西亚公司的 Sephadex G25 的 PD-10 柱、NAP™-10 柱或 HiTrap 脱盐柱脱盐。

沉淀/重悬浮法也是很好的方法，但也会丢失蛋白质。

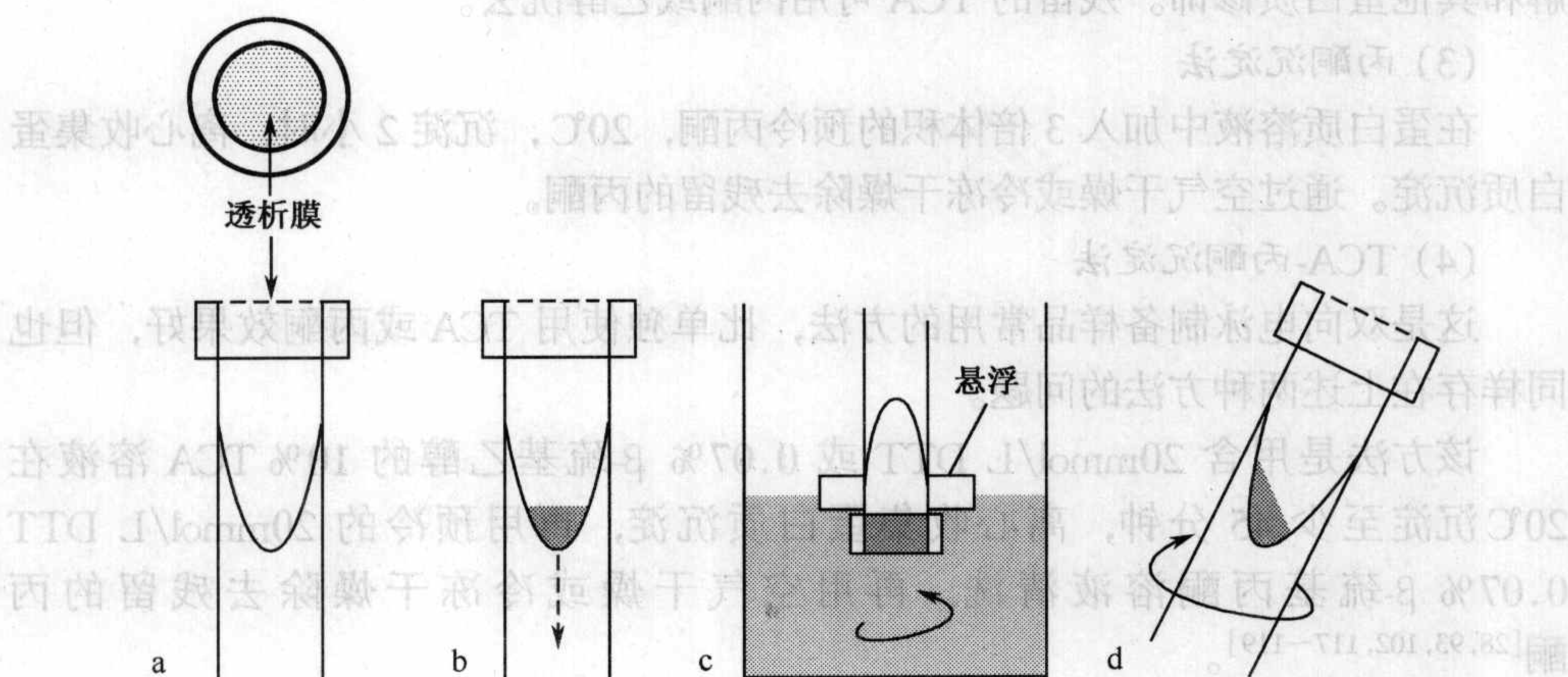


图 8.12　微量透析

(a)带有透析膜盖的样品管;(b)加样,旋紧盖子;(c)倒置于透析液中,并搅拌透析;(d) 离心收集样品

(2) 核苷、代谢物、磷脂等的清除

这些内源性的小分子大多带负电。因而影响阳极附近的酸性蛋白质聚焦。TCA/丙酮沉淀法对清除这些物质很有效。

(3) 去污剂的清除

SDS 能与蛋白质形成带负电的复合物，对等电聚焦影响很大，必须清除或尽可能降低其浓度。可用含有载体两性电解质或两性离子去污剂（CHAPS、Triton X-100 或 NP-40）的溶胀液稀释含有 SDS 的样品液，直至终浓度为 0.25%以下，并使上述去污剂与 SDS 的浓度比为 8∶1[92]。在室温下，丙酮沉淀能除去部分 SDS。但蛋白质沉淀需要在 −20℃。

(4) 核酸的清除

核酸能与蛋白结合，影响聚焦。而且核酸分子大，堵塞凝胶造成拖尾。核酸还能被银染，影响结果分析。

为了清除核酸可在样品中加入 0.1 倍体积的含 1 mg/ml DNase Ⅰ，0.25mg/ml RNase A 和 50m mol/L $MgCl_2$，然后在冰上保温[109, 120]使核酸降解成单核苷酸或寡核苷酸。但要注意这两种酶也有可能在双向电泳图谱呈现蛋白斑点。

用超离心方法也能除去核酸，但也可能除去大分子质量的蛋白质。

在低离子强度时，带负电的核酸和带正电的蛋白质会形成复合物，所以用高 pH 和高离子强度的溶液能减少这种反应，但最后还必需去盐。

(5) 多糖的清除

带负电的多糖会与蛋白质形成复合物。多糖不会堵塞凝胶孔，导致拖尾和影响聚焦。

超离心和高 pH，高离子强度方法也能用于清除多糖。此外，也可用 TCA，硫酸铵或醋酸铵沉淀法清除多糖。

(6) 脂类的清除

脂类能与去污剂结合，减弱去污剂的作用。它还能与许多蛋白质，特别是脂蛋白结合，降低可溶性，并影响 pH 和分子质量。用丙酮沉淀法能除去部分脂类。过量的去污剂能减弱蛋白质与脂类的结合。

(7) 酚类化合物的清除

酚类化合物存在于植物组织中，它们能通过酶催化氧化反应修饰蛋白质[117,123]。

在样品制备时，可以用还原剂（如 β-巯基乙醇、DTT、亚硫酸盐、抗坏血酸盐等）来防止酚催化的氧化反应。

利用抑制剂如二乙基二硫代氨基甲酸（diellyldithio cabamic acid）或硫脲抑制多酚氧化酶的作用，还可用吸附剂 polyvinylpyrrolidone（PVP），poly vinylpolypyrrolidone（PVPP）吸附酚基化合物。此外，上述各种沉淀技术也可将蛋白质从酚类化合物中分离出来。

(8) 不溶物质的清除

不溶物质会堵塞凝胶孔，造成拖尾。可用高速离心（如 40 000g，30min，20℃）除去，最好在第一向等电聚焦加样前将贮存的样品离心。很多公司都备有一些清除污染物的试剂盒。如 GE 医疗集团，安玛西亚公司有 2-D Clean-up Kit 和 SDS-PAGE Clean-up Kit。

在样品处理过程中，必须对蛋白质的化学修饰和解聚的影响减到最小。双向电泳对电荷的改变是非常灵敏的，它将使谱中蛋白点增多。一些富有蛋白酶的样品应该在冷环境下快速操作或加蛋白酶抑制剂，但蛋白酶有时也会引起蛋白质电荷的变化。样品中一般都含有尿素，所以不要加热，因为尿素分解产生的异硫氰酸盐会引起氨基甲酰化而导致电荷的不均一性。

(1) 体液样品

用于双向电泳分析的样品，如血清、血浆、尿、脑脊液、精液、汗、泪、羊水、水痘液等，应尽可能使用新鲜体液。如需收集，样品应保存在 -20℃～-70℃，且保存时间不宜过长[122]。

血清和血浆可以直接溶解在解聚缓冲液中。蛋白质浓度较低，盐浓度较高的体液会干扰等电聚焦，所以必须先透析再浓缩，或用脱盐柱脱盐。脑脊液可先对 10% 聚乙二醇透析，再浓缩 4 倍，加样 15μl[123]。

分析血清中的蛋白对研究健康和疾病有重要意义。人血清是一种复合物，含有数千种蛋白，浓度变化至少 9 个数量级。白蛋白和 IgG 超过总蛋白的 60%。双向电泳分析时，这两种高丰度蛋白的存在经常会掩盖有相似等电点/分子量的其他重要的蛋白。所以在样品制备过程中应去除这两种蛋白，以使低丰度蛋白浓

缩可见。

各大公司都有试剂盒提供，如GE医疗集团，安玛西亚公司去除这两种蛋白的试剂盒“Albumin and IgG Removal Kit”。它是使用选择性结合这些蛋白的树脂，从Microspin柱上洗脱样品，再进行简单的丙酮沉淀，即可在双向电泳凝胶上加样。与其他的白蛋白去除方法包括Cibacron™ Blue方法相比，该树脂有高度特异性，仅有很少的交叉反应活性。据称血清白蛋白和IgG的去除可超过95%。

尿液在进一步处理前应离心15分钟（2000g）。每升健康成人尿中只有0.1g蛋白。可用离子交换层析、超离心、透析或冻干等方法除去尿中大量的盐和非蛋白质成分[124~127]。虽然不处理不浓缩，用银染也能得到600多个点[128]，但处理后样品分辨率更高。

不经浓缩的脑脊液和羊水也能用于双向分析[129]。冻干会引起蛋白质的修饰，如天门冬氨酸和谷氨酰胺的脱氨作用和半胱氨酸的氧化作用[130]。浓缩可采用丙酮沉淀的方法，如Dunn[131]用1ml冷丙酮将100μl样品处理1小时，再在-20℃离心。结果没有丢失蛋白点（可能有量的丢失）。

（2）培养的细胞

组织培养的细胞可以不经处理，直接在培养块（孔）中用裂解液裂解。小心吸出裂解液后，细胞层用磷酸缓冲液或用等渗蔗糖溶液洗，以减少污染（这一步也可省略），然后用少量样品缓冲液溶解后在-70℃保存备用。少量的核酸不会干扰等电聚焦分离，但大量的细胞要用DNA酶和RNA酶处理[51,132]。

（3）动物组织

组织样品的处理方法很不相同。一般先破碎，（大片组织用机械破碎，小片组织用冻融方法），然后匀浆，再加去污剂[122]。组织中蛋白酶的活性可以用蛋白酶抑制或碱性pH来抑制[127]。

（4）植物组织

大部分植物的组织中只含有较少量的蛋白，但含有较多的酚类化合物会干扰双向电泳分析，所以样品制备相对比较困难。通常可先研磨，并在液氮中匀浆，用蛋白酶抑制剂抑制氧化，如8.3.7.4节中所述用PVP或PVPP吸附酚类化合物，先用TCA/丙酮沉淀，再用丙酮洗沉淀，然后用含有尿素、去污剂、还原剂的溶液溶解沉淀。另一种常用方法是研磨后用带有酚的裂解液萃取，再用醋酸铵的甲醇溶液沉淀蛋白，再用丙酮洗沉淀，然后用含有尿素、去污剂、还原剂的溶液溶解沉淀。

植物组织如种子[132~135]，能和动物组织一样处理。但是叶蛋白在双向分析前必须用丙酮萃取以除去酚醛色素[136]。

理想的样品溶解首先应该破坏蛋白的所有非共价键和聚合体以形成多肽混合物。破坏不完全将导致样品中同时存在聚合体和单个多肽键，结果在双向电泳图中存在假点[40]，因此解聚和溶解是双向电泳分析中很重要的因素。最常用的溶

解液是O'Farrell使用的9mol/L尿素和2%（*W/V*）非离子去污剂（NP-40或Triton X-100）。但它不能解聚所有的蛋白质。膜蛋白可先用SDS溶解（SDS∶膜蛋白=1∶3），再加高浓度的SDS和NP-40（SDS∶NP-40=1∶8），关键是控制好比例。采用这种方法时由于硫酸盐和载体两性电解质的相互作用有可能损失酸性范围的分辨率。另外，SDS和NP-40会形成微团在等电聚焦时向阳极迁移[6]，使蛋白质被暴露在只含有很少去污剂的环境中而产生沉淀[137]。膜蛋白也可溶解在含有碳酸钾（pH 10）的NP-40和尿素溶液中[139]。红血球的膜蛋白可用9mol/L尿素，6.4%（*W/V*）Triton X-100，205mmol/L L-赖氨酸，5mmol/L二硫苏糖醇和15mmol/L sodium thioglycolate溶解[139]。用Triton X-114代替Triton X-100通过温度引起的相分离也能达到溶解的目的[140,141]，这个方法已被成功地用于白细胞膜蛋白的双向电泳[142]。Deoxycholate可代替SDS用于微粒体蛋白质的溶解[143]。两性离子去污剂CHAPS可有效地用于微粒体蛋白质的双向电泳分离[35,36]。Sulphobetaine（SB）是一种两性离子型去污剂，它虽然有很好的溶解性能，但与载体两性电解质竞争，并在8mol/L尿素溶液中生成沉淀，单独使用时无效，所以不宜使用[144,145]。

Görg曾建议在样品制备时用一点Ultrodex悬浮液[28]（一种原瑞典LKB公司生产的颗粒凝胶，实际上是特殊纯化的Sephadex）。在1ml O'Farrell裂解液中加40mg Ultrodex作为悬浮液。加样前与蛋白质溶液等量混合。在蛋白质溶液中加Ultrodex悬浮液有两个好处：①在等电聚焦开始时，防止蛋白质在凝胶表面产生沉淀；②防止样品溶液从加样框中洩漏。但不可以用Ultrodex粉末代替悬浮液，因为蛋白质有被吸附的危险。2004年5月，Görg在西安和北京的报告中推荐使用Multiphor（原瑞典LKB公司）的制备附件，用Ultrodex作凝胶介质，对样品进行预分离。方法请参见第12章。

由于固相pH梯度等电聚焦本身的特性，一般IPG-DALT比ISO-DALT允许的加样量大。加样量取决于样品的特性以及凝胶条的pH梯度范围和长度。如采用银染色，在180mm长、3～4pH间隔的凝胶条上可以加50～100μg的样品，加样量以20μl为宜。过量的加样会引起双向电泳图的畸变，特别在第二向电泳时会产生很多问题。样品液中的蛋白浓度不应超过5mg/mL，否则在加样处由于蛋白质的凝聚和沉淀会产生水平和垂直的纹理现象[32]。

蛋白质浓度的测定可以使用常规的分光光度法。GE医疗集团，安玛西亚公司推出的2-D Quant Kit是用2% SDS、1% DTT、8mol/L尿素、2 mol/L硫脲、2% Pharmalyte或2% IPG缓冲液，基于蛋白和铜离子的结合，在480nm进行蛋白定量。样品体积为1～50μl，线性范围0～50μg。

根据等电聚焦的原理，样品可以加在凝胶的任何位置，但由于尿素在碱性pH时产生的异硫氰酸盐会使蛋白的氨基甲酰化，所以加在阳极侧为宜[146,147]，如植物蛋白质、鼠肝蛋白质、酵母细胞蛋白质[32]等加在阳极侧能得到较好的结

果。但也有的蛋白质，如人的心脏蛋白质萃取物则加在阴极为宜[32]。上样前最好先将样品离心，以去掉不溶性颗粒。

目前双向电泳第一向固相 pH 梯度等电聚焦的加样方法有两种。一种是在干胶条泡胀时或在泡胀后在泡胀盘中加样。另一种是泡胀后在干胶条上的加样杯中加样。

用样品杯与泡胀盘加样各有利弊。

用样品杯加样	用泡胀盘加样
(1) 容易渗漏	(1) 不会渗漏
(2) 蛋白聚集在加样点	(2) 加样均匀
(3) 上样量受限制	(3) 加样量可以多达 5mg
(4) 碱性蛋白分离效果好	(4) 碱性蛋白分离效果不好
(5) 泡胀时蛋白不易发生水解	(5) 泡胀时，蛋白容易发生水解

8.3.7.5 样品制备中的多级分离

1999 年在日本召开的国际电泳会议上，人们都关注蛋白质组学研究中的一个十分重要的问题，那就是双向电泳前样品中蛋白质的多级分离，因为只有这样，才能将细胞、组织中的全部蛋白质进行鉴定分析。但是低丰度蛋白、膜蛋白和不溶性蛋白的分离和溶解始终是生命科学研究中的一大技术难题。人们正寻找各种有效的去污剂和分离方法。现在各大公司已有相关的试剂盒可供选用。如 GE 医疗集团，安玛西亚公司的 2-D 部分收集试剂盒（2-D Fractionation Kit）。

8.3.8 聚焦参数

不管是 ISO-DALT，还是 IPG-DALT，在第一向聚焦电泳的凝胶和样品中都含有高浓度的尿素，为防止尿素在电泳时析出，电泳时的温度应该在 20℃ 为宜。

ISO-DALT 系统的第一向聚焦时间可参照第 6 章所述的方法决定[146,147]，聚焦时间不够会影响分辨率，聚焦太长会引起阴极漂移并丢失碱性蛋白。同样地，IPG-DALT 的第一向聚焦时间也不能过长或过短。由于尿素和去污剂的存在，一般来说聚焦时间比前者要长。合适的聚焦时间取决于样品量、去污剂的浓度、分离距离和 pH 范围。虽然由于固相 pH 梯度的稳定性，延长聚焦时间并不会产生阴极漂移，但过长的聚焦时间会丢失蛋白质斑点[32]。

为了使样品进入凝胶，可以不进行预聚焦，但在电泳开始时采用低电压[32]。

8.3.9 IPG-DALT 系统第一向电泳时的油层覆盖

在原 Pharmacia-LKB 公司的 IPG-DALT 双向电泳附件说明书中指出[53]，在

进行固相 pH 梯度凝胶等电聚焦时，为了防止尿素析出、蛋白氧化、冷凝水等，应在凝胶表面铺一层硅油或液体石蜡。前者是非常昂贵的消耗性试剂。作者曾用液体石蜡铺层覆盖，虽然比较经济，但操作十分繁琐。最近 Cörg[32] 在综述中用图表明，在 pH4～9 和 pH6～10 的双向电泳中，油层对双向电泳的结果影响不大。Steinberg 建议在进行极窄 pH 梯度范围的微量制备时[46]和 pH10～12 范围的双向电泳时用油层覆盖。

近年来，新推出的 IPG 等电聚焦仪器，所需的覆盖硅油的量大大减少，是一个很好的改进。

8.3.10　双向间的平衡和转移

在 O'Farrell 方法[6]中，等电聚焦凝胶条在加到第二向以前应先平衡，但平衡过程导致蛋白质丢失约 5%～25%[6,34,67]，还会使分辨率降低，平衡 30min 时，蛋白质带变宽 40%[6]，所以平衡时间不可过长。如果不平衡，把等电聚焦凝胶直接放在第二向凝胶上会导致高分子质量蛋白质的纹理现象，并且等电聚焦胶会黏在 SDS 胶上[6]。为了减少等电聚焦后的扩散，有人建议使用干冰冷却凝胶，但即使短短的 2 分钟，尿素便析出。虽缩短平衡时间可以减少扩散，但同时会减少向第二向的转移。

双向凝胶之间的界面接触是十分重要的，如使用管状凝胶，常将凝胶放在缓冲液配制的琼脂糖中，但琼脂糖中的不纯物会在银染时显示假斑点[37]。如用垂直电泳，SDS 胶的顶部浓缩胶应该有平衡缓冲液，避免凝胶被拉长，否则会引起带的歪斜和双向谱的畸变。如使用水平电泳，凝胶聚合在支持膜上不会被拉长，只要在胶面接触时避免气泡陷入便可[37]。

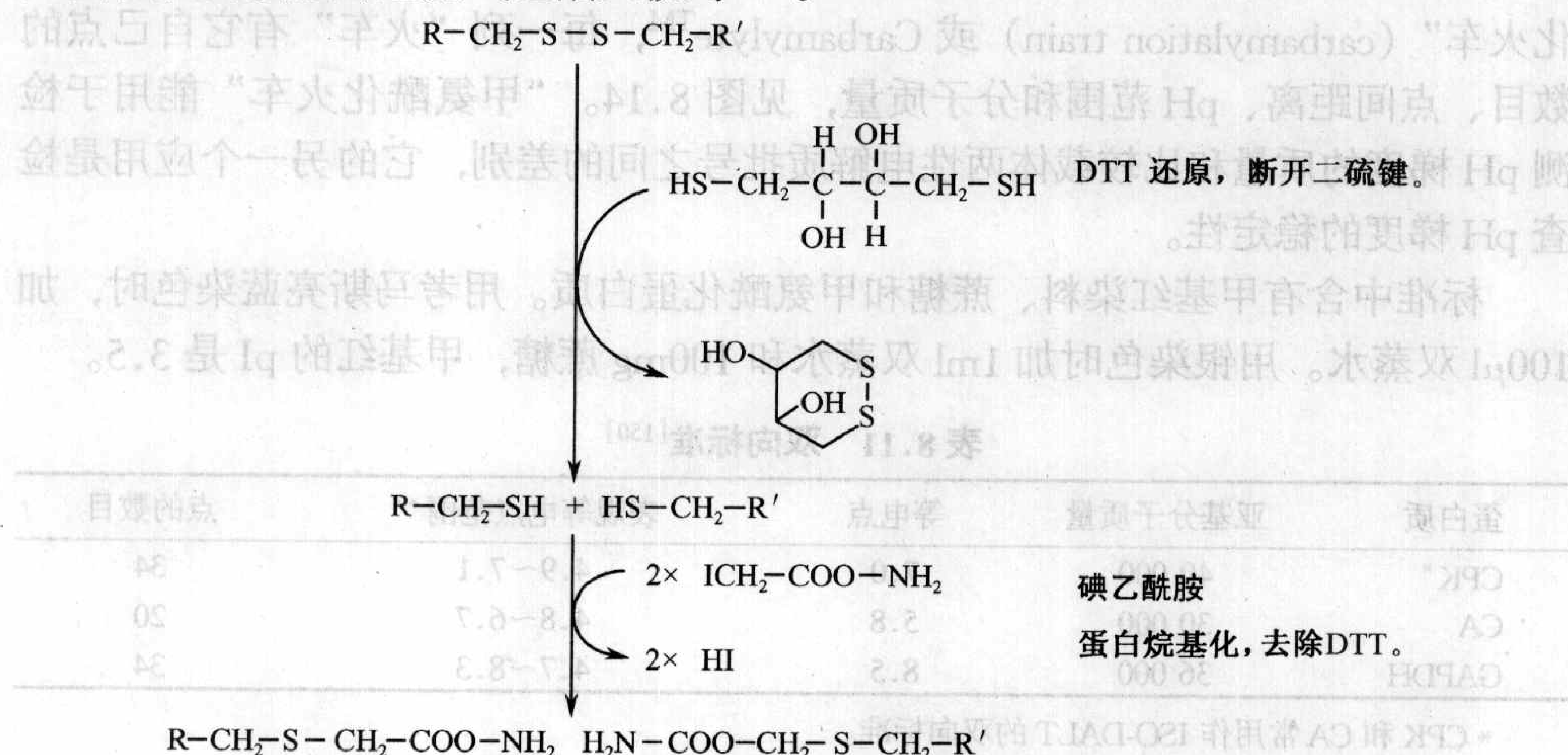


图 8.13　DTT 和碘乙酰胺的作用

为了使蛋白比较完全地从第一向转移到第二向，与载体两性电解质凝胶条相比，固相 pH 梯度凝胶条的平衡时间应延长到 20～30 分钟（取决于凝胶条的宽度）。这是因为后者与蛋白的结合比较紧。在 IPG-DALT 方法中，如果不平衡并不会增加蛋白点，但由于银染时的高背景会使一些蛋白点观察不到[28]。在平衡液中加尿素和甘油是非常有效的。在第二步平衡液中的碘乙酰胺由于烷基化作用保护巯基，防止蛋白质氧化修饰，捕集过量的 DTT，可以排除双向电泳的纹理现象（streaking）[149]。见图 8.13。

8.3.11　双向电泳蛋白质标准

GE 医疗集团，安玛西亚公司的双向电泳蛋白质标准包种三种高纯度的甲氨酰化蛋白（carbamylated protein）[150]。它们可以作为第一向等电聚焦电泳中的内标准和第二向中的低分子质量标准结合使用。

甲氨酰化蛋白质是将蛋白在尿素溶液中加热不同时间得到的。带正电的氨基与尿素反应形成衍生物，每一次反应产生一个低等电点的衍生物。混合加热不同时间的甲氨酰化蛋白质和原来未甲氨酰化的蛋白质进行等电聚焦就能在双向电泳谱中得到一系列点。点的分布范围是从原来的，未甲氨酰化的蛋白质到完全甲氨酰化的蛋白质。每个点有相同的分子质量不同的等电点。最高的等电点是碱性的未甲氨酰化的蛋白质，最低的等电点是完全甲氨酰化的蛋白质。

这三种甲氨酰化蛋白质标准[150]是肌酸磷酸转移酶（creatine phosphokinase，CPK）、碳酸酐酶（carbonic anhydrase，CA）和甘油醛-3-磷酸脱氢酶（glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase，GAPDH），供不同 pH 范围使用，见表 8.11[150]。每种标准在所给 pH 范围给出一系列点，这一系列点被叫做“甲氨酰化火车”（carbamylation train）或 Carbamylyte™，每一列“火车”有它自己点的数目、点间距离、pH 范围和分子质量，见图 8.14。“甲氨酰化火车”能用于检测 pH 梯度的质量和比较载体两性电解质批号之间的差别，它的另一个应用是检查 pH 梯度的稳定性。

标准中含有甲基红染料、蔗糖和甲氨酰化蛋白质。用考马斯亮蓝染色时，加 100μl 双蒸水。用银染色时加 1ml 双蒸水和 100mg 蔗糖，甲基红的 pI 是 3.5。

表 8.11　双向标准[150]

蛋白质	亚基分子质量	等电点	表观等电点范围**	点的数目
CPK*	40 000	7.0	4.9～7.1	34
CA	30 000	5.8	4.8～6.7	20
GAPDH	36 000	8.5	4.7～8.3	34

* CPK 和 CA 常用作 ISO-DALT 的双向标准。

** 等电点是在水平平板电泳上用表面电极测含有尿素的胶上的甲氨酰蛋白质得到的。

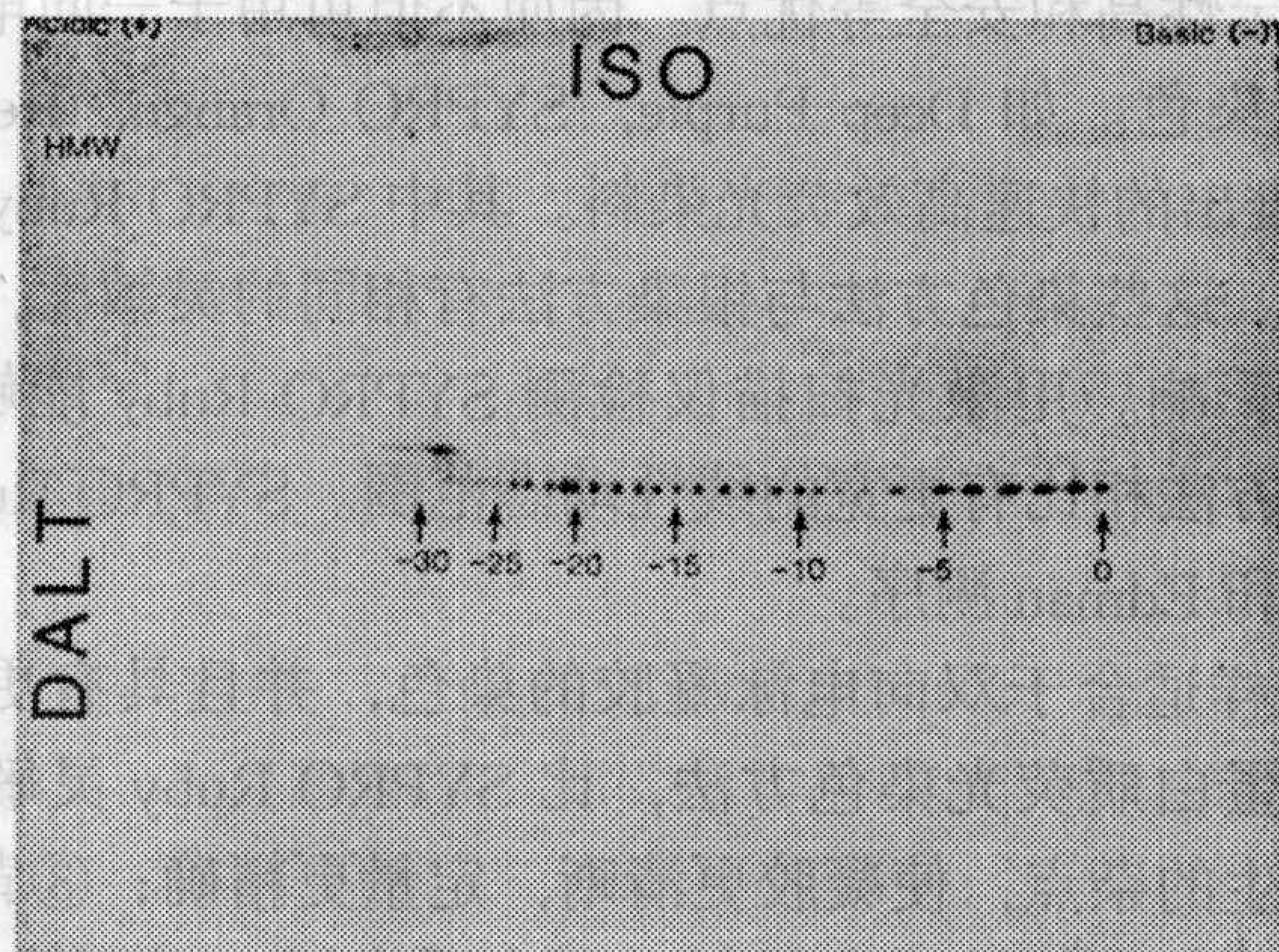


图 8.14　在 ISO-DALT 系统中的 CPK 甲氨酰化火车[150]

8.3.12　点的延长和扩散

点的水平延长的大部分原因是由于第一向的胶条拉长或两向凝胶之间的接触不好而导致转移时分子的扩散。点的纵向延长的原因则可能是第一向凝胶条太宽或第二向 SDS 电泳的浓缩胶太窄。如果用 12cm 左右分离距离的水平电泳。建议第一向电泳的胶条宽度为 3mm，第二向浓缩胶的宽度为 50mm。

点扩散可能是由于过量加样引起的，另一原因可能是电泳过程中的焦耳热。

8.3.13　纹 理 现 象

双向电泳图谱中条纹状的纹理现象（streaking）是常见的问题。

水平条纹与第一向（IPG）电泳的时间有关，通常是由于时间不够或在加样处产生沉淀和重新溶解引起的。纵向条纹表明在 SDS 电泳时样品没有完全溶解。

表面条纹也叫做点纹理现象（point streaking）或垂直微量纹理现象（Vertical micro-streaking）。这个现象是由于第一向电泳中有硫赶还原试剂造成的。在第二步平衡时加碘乙酰胺可以减轻这种现象。

点纹理现象（spot streaking）有时是由于 SDS 凝胶的支持膜引起的。为此在灌注 SDS 凝胶前应用双蒸水漂洗支持膜 6 次，每次 10 分钟。如果必要，第一向电泳用的凝胶支持膜也应漂洗。

8.3.14　荧 光 染 色

利用荧光染色进行蛋白质分析具有灵敏度高、定量精确、线性动态范围宽、

使用方便、样品稳定性高和安全等优点。因而不但可用于一向电泳凝胶染色还可用于双向电泳凝胶染色。如 Deep Purple，SYPRO Orange，Red，Ruby 和 Tangerine 等便是近年推出的快速高效荧光染料。其中 SYPRO Ruby 染色还适用于双向凝胶电泳的染色。这些染色方法与银染方法有相同的灵敏度，且蛋白质检测不受核酸和脂多糖的影响。用激光扫描仪检测 SYPRO Ruby 能够达到 ng 级灵敏度，但与传统银染方法相比有更宽的线性动态范围。SYPRO Ruby 染色后的样本可以进行质谱分析和 Edman 测序。

Deep Purple 同样适合于双向电泳凝胶的染色，并且具有更多的优点：①是迄今为止最灵敏的蛋白质荧光染色方法，比 SYPRO Ruby 灵敏 8 倍；②在胶上不会有染色颗粒产生的杂点，使凝胶更清晰，定量更精确；③背景色浅，以便检测低丰度蛋白；④这种染料是天然材料，不含重金属，对环境无害；⑤黏度低，易于操作；⑥适合后续的质谱和 Edman 测序。详细操作程序参见 8.3.15 节。

8.3.15　在双向凝胶电泳中的荧光差异技术

双向电泳是一种比较技术，因此对重复性有特别高的要求。用于比较结果的两块凝胶，如果在电泳过程中由于凝胶配制、聚合、电泳参数、染色等有操作差异，便会使结果比较失去可靠性。1997 年 Ünlü[151] 首先用不同荧光染料标记两种样品，加在同一块凝胶中进行双向电泳，这样不但得到了与银染相当的灵敏度，简化了染色，脱色的繁杂过程，并能与质谱分析兼容，最重要的是这一方法是在同一块凝胶上比较带不同荧光染色的两种样品，，排除了凝胶聚合、电泳和染色过程的差异，保证了定性比较的准确度。2003 年 Alban[152] 在凝胶中引入了内标（用另一种荧光染料标记样品），这样又使这个技术得到了定量的保证。这种方法称为双向电泳的荧光差异技术（2-D fluorescence difference in gel electrophoresis，或 2-D difference in gel electropho resis，2-D DIGE，作者认为应缩写为 2-D FDIGE 才能体现荧光差异的意思）。双向电泳的荧光差异技术是目前检测蛋白表达水平最快、最灵敏、最准确的方法。用于这个技术的三种荧光染料为 Cy^{TM}2，Cy3 和 Cy5。它们是 *N* 羟基琥珀酰二亚胺衍生物。前一种常用作内标，后二种用于标记不同的样品。这些荧光团具备以下特性。

(1) *标记前后蛋白质的等电点不变，分子质量也基本不变*　在第一向等电聚焦时，在整个宽 pH 范围的荧光发射光谱没有变化。在 SDS 凝胶中平衡迁移，不同样品中相同标记的蛋白会迁移到相同的位置，而与所使用的染料无关。这是因为 CyDye 特异性地共价标记蛋白质赖氨酸的 ε 氨基，可以补偿由于标记而失去的赖氨酸残基的正电荷且仅仅带来极小的几乎相同的分子质量的增加而防止了等电点的偏离（在 pH<10 和低分子质量范围）和假的蛋白质的出现。

(2) *光谱可被分辨*　每种荧光团都有自己特征的发射光谱，相互不干扰，以

保证准确度。见表 8.12 和图 8.15。

(3) 高灵敏，明亮　可用于最小标记技术。在标记、电泳和扫描时，染料是光稳定的，荧光损失很小。

表 8.12　CyDye DIGE 荧光团特性

荧光团	荧光色	最大激发波长(nm)	最大发射波长(nm)	摩尔吸光系数	结合到蛋白上的分子质量(Da)
Cy2	绿	491	509	135 000	434
Cy3	橙	553	569	133 000	466
Cy5	红	645	664	217 000	464

每个蛋白质样品在双向电泳前用一种荧光染料标记，用不同荧光团（染料）标记的样品被加在同一块凝胶上，以确保在第一向和第二向电泳时有严格相同的电泳条件。电泳后，通过选择合适的荧光激发波长，不同荧光团标记的样品显示不同颜色的荧光可以在屏幕上清晰可见。

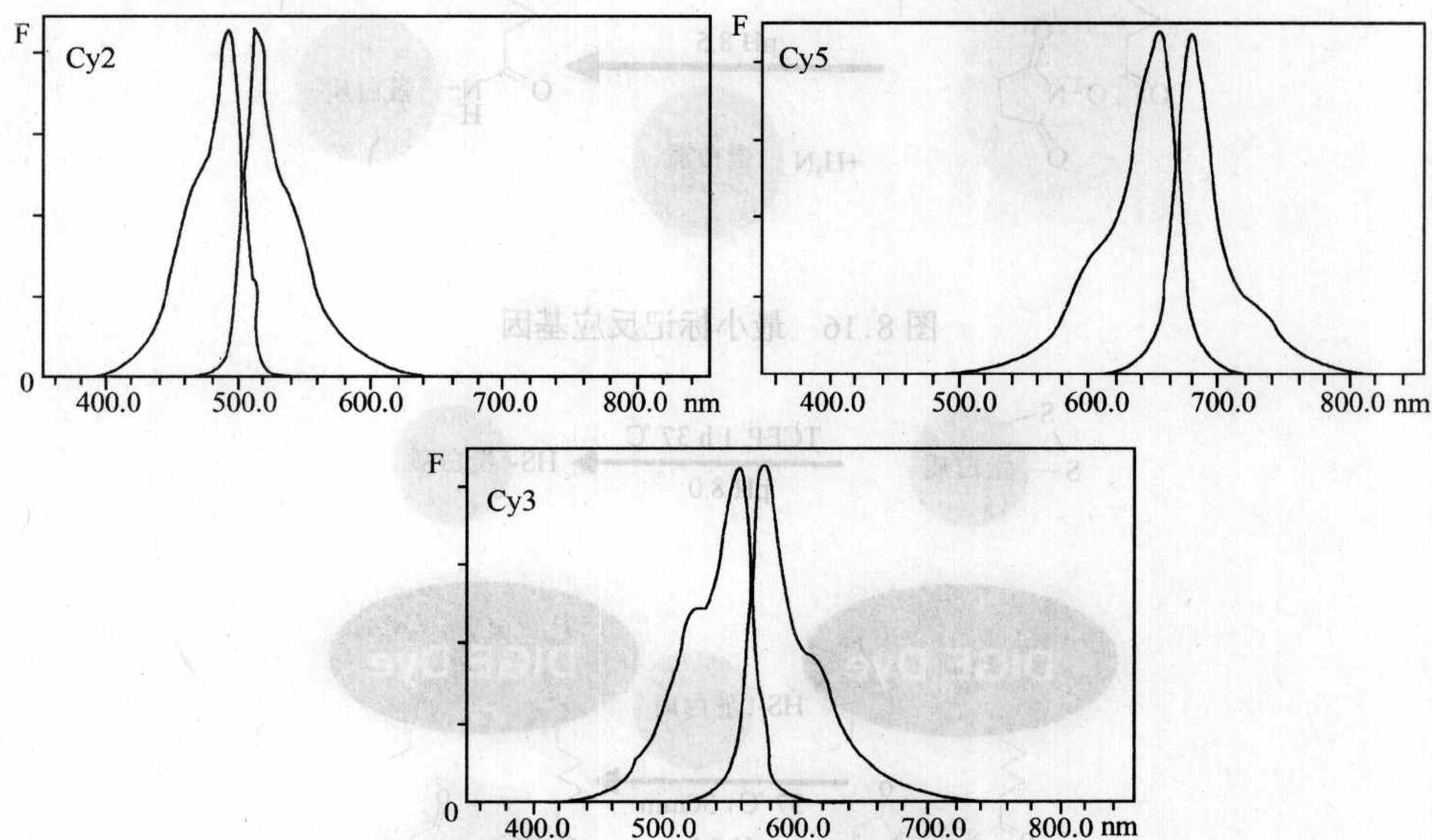


图 8.15　CyDye 荧光团 Cy2、Cy3 和 Cy5 的荧光激发光谱和发射光谱

标记方法有两种：一种是最小标记法（minimal labeling method），另一种是饱和标记法（saturation labelling method）或称为痕量样品标记法（scarce sample labelling method）。前一种方法标记在赖氨酸的 ε-氨基上，为一般样品所采用，后一种方法标记在胱氨酸的巯基上，适合于低丰度样品的分析。见表 8.13，图 8.16 和 8.17。

表 8.13　最小标记法和饱和标记法的差别

	最小标记法	饱和标记法
蛋白质质量	50μg	5μg
荧光团	Cy™2、Cy3、Cy5	Cy3、Cy5
反应基因	NHS 酯	马来酰亚胺
被标记的氨基酸残基	赖氨酸（$-NH_2$）	胱氨酸（-SH）
最适 pH	pH8.5	pH8.0
标记原理	偶合、淬灭	还原、偶合、淬灭
平衡	DTT/碘乙酰胺	DTT
灵敏度	与银染相当	与银染相当

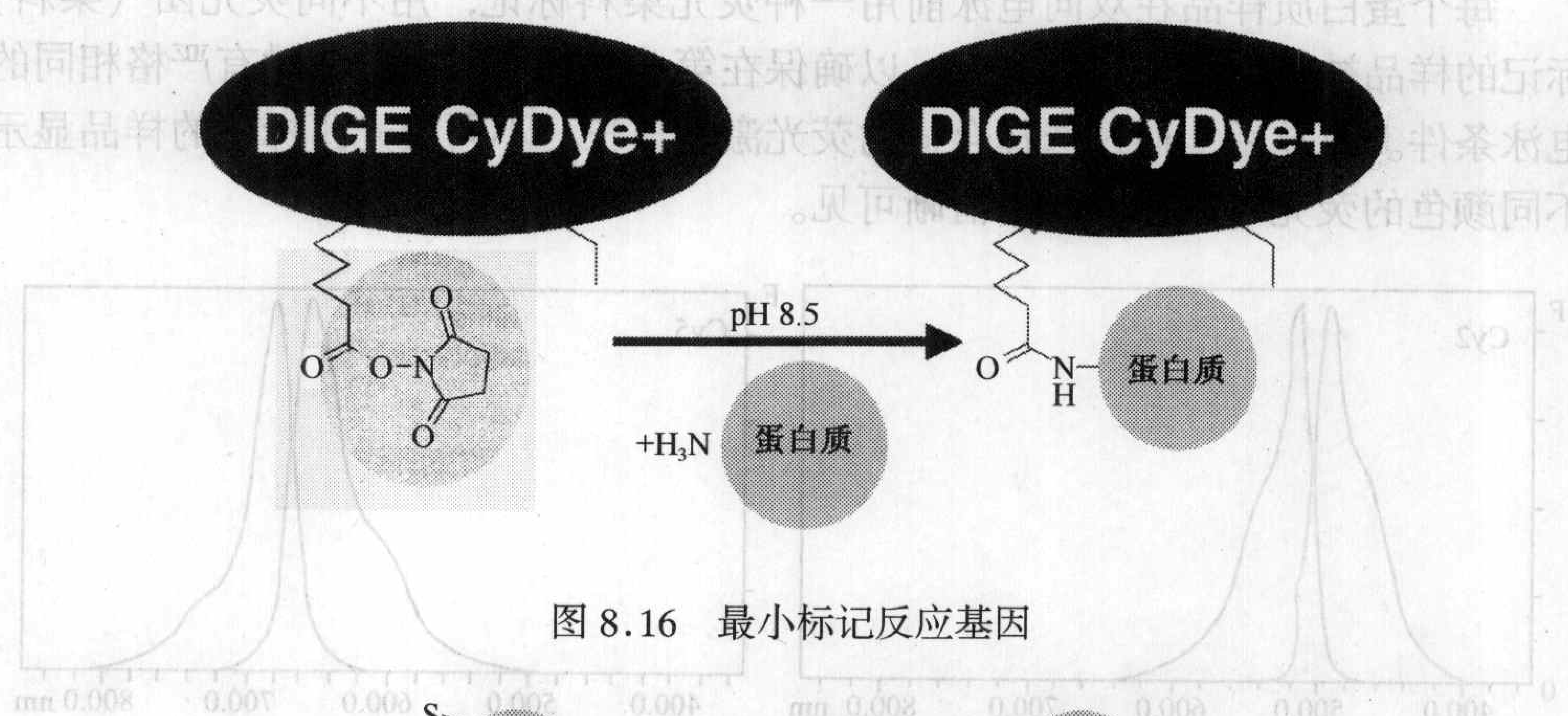


图 8.16　最小标记反应基因

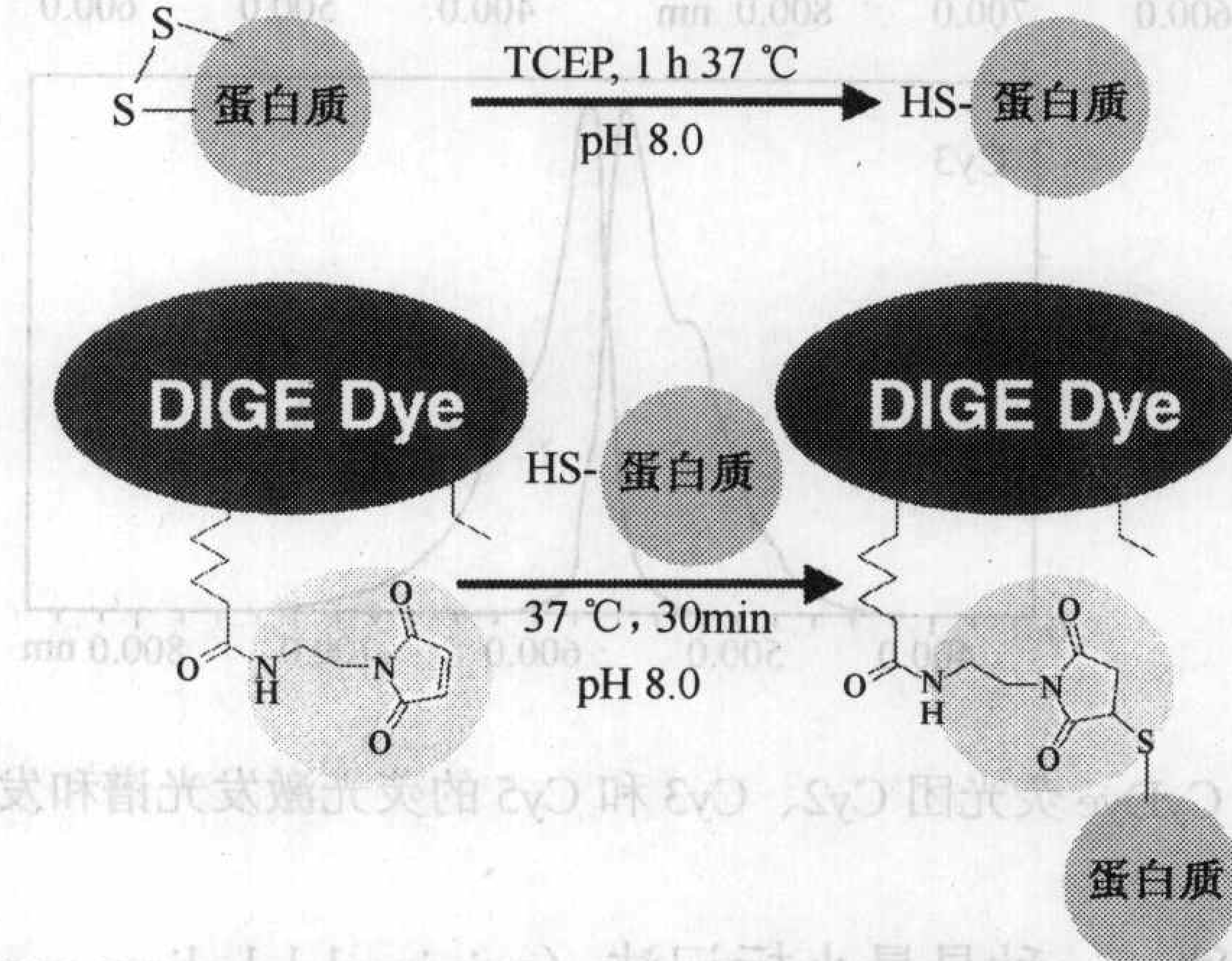


图 8.17　饱和标记反应基因

由于荧光方法的高灵敏度，特别是 CyDye 的高量子产率，使得可以做到每个蛋白质用一种染料的最小标记。用最小标记技术时，CyDye DIGE 荧光团的浓

度可以小到在样品中每个蛋白质仅仅标记一个染料分子，其结果在样品中只有约3%（1%～5%）的蛋白质被标记。CyDye荧光团有一个NHS-酯反应基因，通过酰胺链共价结合到赖氨酸的ε-氨基上。赖氨酸残基上有一个正电荷，CyDye荧光团也有一个正电荷，当它结合到赖氨酸残基上便替代其正电荷，所以蛋白质的等电点不会改变，但它将增加大约500分子质量到蛋白质上。

由于荧光团电荷和分子质量的匹配性质，用2种或3种荧光染料标记的蛋白质样品，在同一块双向电泳凝胶中是重叠的，这就使得很小的蛋白质表达水平的差异都能被检测，并且使用相应分析软件可以直接进行互相比较。

样品标记方法如图8.18，需要40分种。样品制备后应立即使用，或在－70℃暗处保存。

虽然荧光标记方法有上述很多优点，现已得到一定的应用[153～181]。但是由于荧光试剂和设备的花费较大，特别是饱和标记法，所以它的发展受到了一定的限制。

使用CyDye DIGE最小标记技术标记的双向电泳凝胶，由于样品中只有约1%～5%的蛋白质被标记，为了取点、酶解和质谱分析的需要。有时可以用Deep Purple（深紫）全蛋白染料进行后染色[184,185]。这是一种新的超灵敏荧光染料，可以检测蛋白带（单向电泳）内低于0.5ng的蛋白质。染色方法如表8.14。

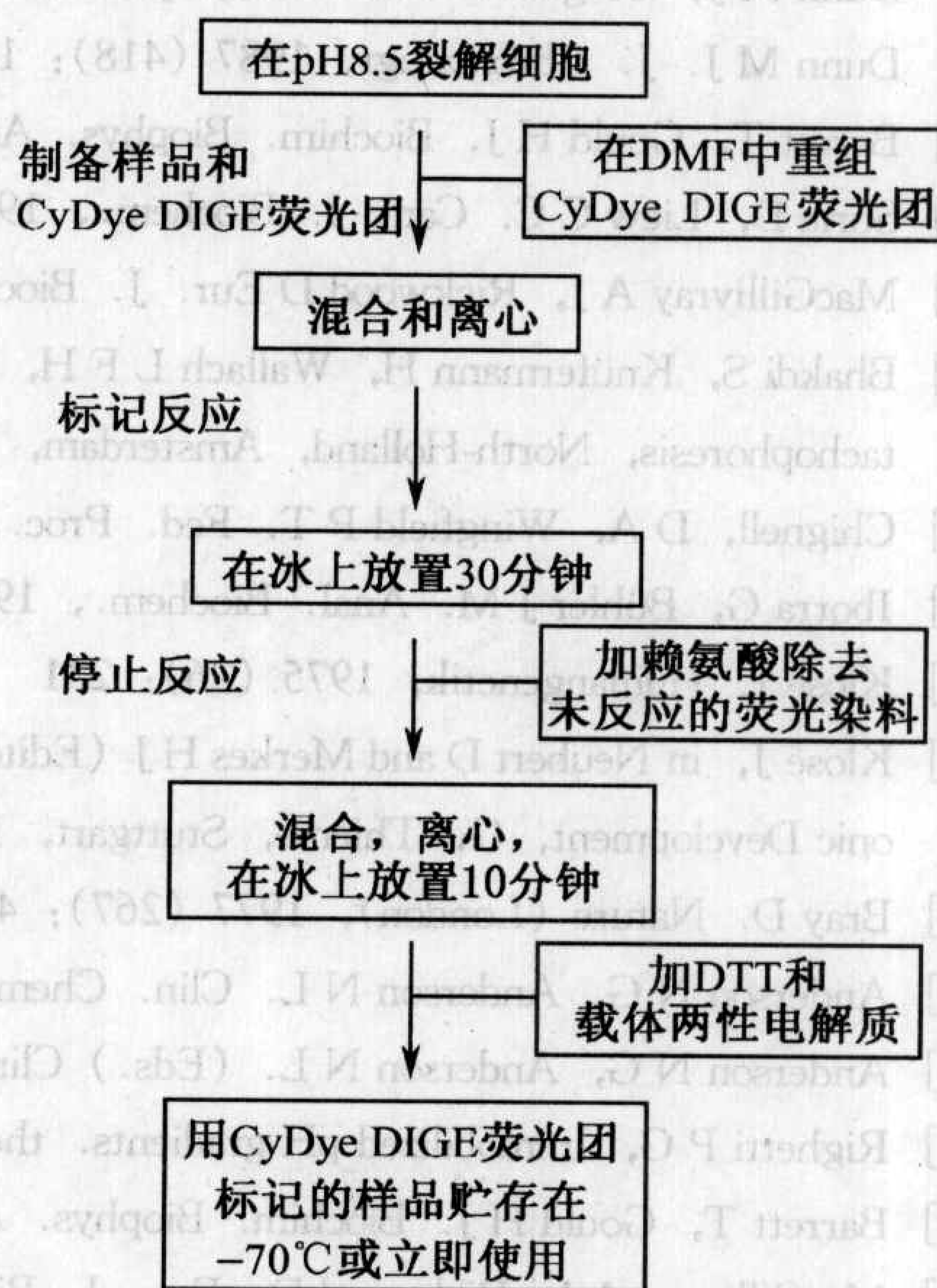


图8.18　最小标记法程序

只用Deep Purple染色的一向或双向电泳凝胶可用532nm激发，560nm荧光发射来检测。但用CyDye DIGE预标记，再用Deep Purple后染色的凝胶则用457nm激发，610nm荧光发射检测，以避免Cy2和Cy3信号的干扰。凝胶可保存在4℃稳定液中。

表8.14　Deep Purple全蛋白染色方法

步骤	时间
1. 固定：75%乙酸＋10%甲醇	过夜
2. 漂洗：蒸馏水	4×10分钟
3. 染色：1∶200稀释染色液	60分钟
4. 显色：1∶1000稀释氨水	3×10分钟
5. 稳定：0.75%冰乙酸	扫描前漂洗10分钟

参考文献

[1] Klose J, Kobalz U. Electrophoresis. 1995 (16): 1034～1059

[2] Wilkins M, et al. Biotechnol Genet Eng Rev. 1996 (13): 19～50

[3] 赵从建，郭尧君，刘少君，现代科学仪器. 2000 (5): 16～19

[4] Rabilloud T. Proteomics. 2002 (2): 3～10

[5] Fey S J, Larsen P M, Current Opinion in clemical biology 2001 (5): 26～33

[6] O'Farrell P, J. Biol. Chem., 1975 (250): 4007～4021

[7] Klose H, Human Genetik 1975 (26): 231～235

[8] Dunn M J, Burghes A HM. Electrophoresis, 1983 (4): 97～116, 173～189

[9] Dunn M J. J. Chromatogr, 1987 (418): 145～185

[10] Barret T, Gould H J. Biochim. Biophys. Acta., 1973 (294): 165

[11] Suria D, Liew C C. Can. J. Biochem., 1974 (52): 1143

[12] MacGillivray A J, Rickwood D Eur. J. Biochem., 1974 (41): 181

[13] Bhakdi S, Knüfermann H, Wallach L F H, in P. G. Rhigetti, Progress in lsoelectric Focusing and Isotachophoresis, North-Holland, Amsterdam, 1975, 281

[14] Chignell, D A, Wingfield P T. Fed. Proc., Fed. Am. Soc. Exp. Biol., 1974 (33): 1283

[15] Iborra G, Bühler J M. Anal. Biochem., 1976 (74): 503

[16] Klose J. Humangenetik, 1975 (26): 231

[17] Klose J, in Neubert D and Merkes H J (Editors), New Approaches to the Evaluation of Abnormal Embryonic Development, G. Thieme, Stuttgart, 1975, 375

[18] Bray D. Nature (London), 1977 (267): 481～482

[19] Anderson N G, Anderson N L. Clin. Chem., 1982 (28): 739～1029

[20] Anderson N G, Anderson N L. (Eds.) Clin. Chem., 1982 (28): 737～1029

[21] Righetti P G, Immobilized pH gradients. theory and methodology. Elsevier Amsterdam 1990. 182

[22] Barrett T, Gould H J. Biochim. Biophys. Acta., 1973 (294): 165～175

[23] MacGillivray A J, Rickwood D. Eur. J. Biochem., 1974 (41): 181～191

[24] Scheele G A. J. Biol. Chem., 1975 (250): 5375～5380

[25] Gasparic V, Bjellqvist B, Rosengren A. 1975 Swedish Patent No. 7514049-1

[26] Bjellqvist B, Ek. K, Righetti P G, Gianazza E, Görg A, Postel W, Westermeier R. J. Biochem. Biophys. Methods, 1982 (6): 317～339

[27] Görg A, Postel W, Weser J et al. Electrophoresis, 1988 (9): 37～46

[28] Görg A, Postel W, Cünther S. Electrophoresis, 1988 (9): 531～546

[29] Görg A. Nature, 1991 (349): 545～546

[30] Hanash S M, Strahler J R. Nature, 1989 (337): 485～486

[31] Sinha P, Köttgen E, Westermeier R, Righetti P G. Electrophoresis, 1992 (12): 210～214

[32] Grog A, Boguth G, Obermaier C et al. Electrophoresis, 1995 (16): 1079～1086

[33] Anderson N G, Anderson N L. Electrophoresis, 1996 (17): 443～453

[34] Burghes A H M, Dunn M J, Dubowita V. Electrophoresis, 1982 (3): 354～363

[35] Perdew G H, Schaup H W, Selivonchick D P. Anal. Biochem., 1983 (135): 453

[36] Dunn M J, Burghes A H M, Patel K. Protides Biol. Fluids, 1985 (33): 479

[37] Görg A, Postel W, Westermeier R, Gianazza E and Righetti P G. J. Biochem Biophys. Methods, 1980 (3): 273～284

[38] Willard K E, Giometti C S, Anderson N L, O'Connor T E and Anderson N G. AB, 1979 (100): 289
[39] Ames G F L, Nikaido K. Biochemistry, 1976 (15): 616
[40] Dunn M J, Burghes A H M. Electrophoresis, 1983 (4): 97
[41] Olsson I, LååsT. J. Chromatogr, 1981 (215): 373
[42] Gelsema W J, Ligny C. L de, van der Veen N G, J. Chromatogr, 1978 (154): 161
[43] Gelsema W J, Ligny C L de, van der Veen N G, J. Chromatogr, 1979 (171): 171
[44] Bravo R, Bellatin J, Celis J E. Cell Biol, Int. Rep., 1981 (5): 93
[45] Bravo R, Celis J E. Clin. Chem., 1982 (28): 766
[46] Steinberg R A. O'Farrell P H, Friedrich U, Coffino P. Cell, 1977 (10): 381
[47] Anderson N L, Hickman B J. Anal. Biochem., 1979 (93): 312
[48] Tollaksen S L, Edwards J J and Anderson N G. Electrophoresis, 1982 (2): 155
[49] Klose J, Feller M. Electrophoresis, 1981 (2): 12
[50] Poehling H M, Neuhoff V. Electrophoresis, 1980 (1): 90
[51] Garrels J I. J. Biol. Chem., 1979 (254): 7961
[52] Berkelman T, Stenstedt T, 2-D Electrophoresis principles and methods. Amersham Biosciences, 2001. 83~87
[53] "Immobiline® Dry Stnp Kit for 2D Electrophoresis with hnmobiline Dry Strip and Excel Gel™SDS" Instructions, Pharmacia LKB Biotechonology AB, 1993. 36~37
[54] Yan J X, Wait R et al. Electrophoresis, 2000 (21): 3666~3672
[55] Fernande2-Parron C. Castellanos-Serra L et al. Electrophoresis, 1998 (19): 2398~2406
[56] 贾宇峰，林秋霞，郭尧君等. 生物化学与生物物理进展, 2001 (28): 246~250
[57] 贾宇峰，郭尧君，刘少君. 现代科学仪器, 2000 (5): 20~23
[58] 杨松成. 现代科学仪器, 2000 (5) 9~14
[59] Traini M et al. Electrophoresis, 1998 (19): 1941
[60] Berndt P et al. Electrophoresis, 1999 (20): 3521
[61] Shackelford D A, Mann D. L, Van Rood et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1981 (78): 4566~4570
[62] Tuszyncki G P, Buck C A, Warren L. Anal. Biochem., 1979 (85): 224~229
[63] Shackelford D A, Strominger J L. J. Exp., Med, 1980 (151): 144~165
[64] Jonsson M. Electrophoresis, 1980 (1): 141~149
[65] Poehling H M, Neuhoff V. Electrophoresis, 1980 (1): 90~101
[66] O'Farrell P Z, Goodman H M, O'Farrell P H. Cell, 1977 (12): 1133~1140
[67] Tracy R P, Currie R M, Kyle R A, Young-D S. Clin. Chem., 1982 (28): 900~907
[68] Rabilloud T. Electrophoresis, 1994 (15): 278~282
[69] Righetti P G. J. Chromatogr, 1979 (173): 1~5
[70] Görg A, Postel W, Günther S et al. Electrophoresis, 1985 (6): 599~604
[71] 郭尧君. 生物化学与生物物理进展, 1991 (18): 32~37
[72] 郭尧君. 生物化学与生物物理进展, 1993 (20): 265
[73] Sarmiento M. Electrophoresis, 1995 (16): 431~437
[74] Blomberg A, Blomberg L, Norbeck J et al. Electrophoresis, 1995 (16): 1935~1945
[75] Corbett J. M, Dunn M J, Posch A, Görg A. Electrophoresis, 1994 (15): 1205~1211
[76] Westermeier R, Postel W, Weser J, Görg A. J. Biochem. Biophys, Methods, 1983 (8): 321~330
[77] 万晶宏，钱小红，郭尧君等. 军事医学科学院院报, 1998 (22): 297~300

[78] 万晶宏，罗凌，钱小红，郭尧君等．中国生物化学与分子生物学报，2000（16）：820～826
[79] 赵从建，郭尧君，刘少君等．生物化学与生物物理进展，2000（27）：2000（27）：645～650
[80] 丁勤，郭尧君，刘少君等．生物化学与生物物理进展，2001（28）：683～687
[81] Lee K H, Trends Bjotechnology, 2001（19）：217～222
[82] Rabilloud T, Electrophoresis, 1996（17）：813～829
[83] Rabilloud T, Electrophoresis, 1997（18）：307～316
[84] Molloy M P, Herbert B. R., et al., Electrophoresis, 1998（1）：837～844
[85] Musante L, Candiano G, et al. J. Chromat, 1997（705）：351～356
[86] Pasquali, C., Fialka I. et al. Electrophoresis, 1997（18）：2573～2581
[87] Rabillond T, Electrophoresis, 1998（19）：758～760
[88] 郭尧君．蛋白质电泳实验技术．北京：科学出版社．1999．268～269
[89] Perdew, G H, Schaup H W et al., Aual Biochem, 1983（135）：453～455
[90] Rabilloud T, Blisnick T et al. Electrophoresis, 1999（20）：3603～3610
[91] Santoni V, Molloy M., et al. Electrophoresis, 2000（21）1054～1070
[92] Ames. G E-L, Nikaido K. Biochemistry, 1976（15）：616～623
[93] Damerval C, de Vienne D et al. Electrophoresis, 1986（7）：52～54
[94] Wilson D. L. Hall M. E. et al. Aual. Biochem, 1977（83）：33～44
[95] Marshall T, williams K. M, Aual. Biochem, 1984（139）：502～502
[96] Herbert B R. Molloy M P et al. Electrophoresis, 1998（19）：845～851
[97] Berkalman T, Stanstedt T., 2-D Electrophoresis prinoiples and Methods. Amersham Biosciences, 2001 17～25
[98] Kawaguchi, S I, Kuramitsu S. Electrophoresis, 1995（16）：1060～1066
[99] Teixeira-Gomes A. P. Cloeckaerr. et al. Electrophoresis, 1997（18）：156～162
[100] Cull M, Mchenry C S. Methods Enzymol, 1990（182）147～153
[101] Jazwinski S M. Methods Enzymol, 1990（182）：154～174
[102] Görg A, Postel W et al. Electrophoresis, 1988（9）：681～692
[103] Posch A, Van den Berg B M et al. Electrophoresis, 1995（16）：1312～1316
[104] Lenstra J A, Bloemendal H, Eur. J. Biochem, 1983（135）：413～423
[105] Dignam J. D. Method Enzymol, 1990（182）：194～203
[106] Geigenheimer P. Method Enzymol, 1990（182）：174～193
[107] Theiller C, Delpeyroux F et al. Planta, 1982（155）：478～485
[108] Wolpert T J., Dunkle L D Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1983（80）：6576～6580
[109] Blomberg A, Blomberg L et al. Electrophoresis, 1995（16）：1935～1945
[110] Wu F S, Wang M Y. Anal. Biochem, 1984（139）：100～103
[111] Harrison P A, Black C C Plant Physiol, 1982（70）：1359～1366
[112] Granzier H L M, Wang K. Electrophoresis, 1993（14）：56～64
[113] Colas des Francs C, Thisllement H, et al. Plant Physiol, 1985（78）：178～182
[114] Taylor R S. Wuce et al. Electrophoresis, 1994（15）265～277
[115] England S, Seifter S. Methods Enzymol, 1990（182）285～300
[116] Guy G. R. Philip R. et al. Electrophoresis, 1994（15）：417～440
[117] Granier F. Electrophoresis, 1988（9）：712～718
[118] Tsugita A. Kamo M. Electrophoresis, 1996（17）：855～865
[119] Görg A. Obermaier C. Electrophoresis, 1997（18）：328～337

[120] Marsui N M, Smith D M, et al. Electrophoresis, 1997 (18): 409～417
[121] Fleng Srud R, Kobro G A. Aual Biochem, 1989 (172): 8～15
[122] Tracy R P, Currie R M, Young D S. Clin. Chem., 1982 (28): 890
[123] Merril C R, Goldman D, Sidman S A, Ebert M H. Science, 1981 (211): 1437
[124] Anderson N G, Anderson N L, Tollaksen S L, et al. Edwards J. Anal. Biochem, 1979 (95): 48
[125] Anderson N G, Anderson N L, Tollaksen S L. Clin. Chem., 1979 (25): 1199
[126] Edwards J J, Tollaksen S L, Anderson N G. Clin. Chem., 1982 (28): 941
[127] Tracy R P, Young D S. in Celis J E and Bravo R, Two-Dimensional Gel Electrophoresis of Proteins, Academic Press, Orlando, FL, 1984, 193
[128] Marshall T, Williams K M, Vesterberg O. Electrophoresis, 1985 (6): 47
[129] Marshall T, Williams K M. in Dunn M J, Electrophoresis'86, VCH Verlagsgesellschoft, Weinheim, 1986, 523
[130] Rubin R W, Penneys N S. Anel. Biochem, 1983 (131): 520
[131] Dunn M J, Burghes A H M. in Dunn M. J (Editor), Gel Electrophoresis of Proteins, Wright, Bristol, 1986, 203
[132] Bravo R. in Celis J E, Bravo R (Editors), Two-Dimensional Gel Electrophoresis of Proteins, Academic Press, Orlando, FL. 1984, 3
[133] Görg A, Postel W, Westermeier R. in: Electrophoresis'81 (Allen R C and Arnaud P, eds) de Gruyter, Berlin, 1981. 259～270
[134] Westermeier R, Postel W, Görg A. in: Electrophoresis'81 (Allen R C and Arnaud P, eds) de Gruyter, Berlin, 1981. 281～287
[135] Booz M L, Travis R L. Phytochemistry, 1981 (20): 1773～1779
[136] Hari V. Anal. Biochem., 1981 (113): 332～335
[137] Burghes A H M, Dunn M L, Statham H F, et al. Electrophoresis, 1982 (3): 185
[138] Horst M N, Mahaboobs, Basha M, et al. Anal. Biochem., 1980 (102): 399
[139] Dockham P A, Steinfeld R C, Stryker C L, et al. Anal. Biochem., 1986 (153): 102
[140] Bordier C. J. Biol. Chem., 1981 (256): 1604
[141] Willard-Gallo K E, Humblet Y, Symann M. Clin. Chem., 1984 (30): 2069
[142] Gonenne A, Ernst R. Anal. Biochem., 1978 (87): 28
[143] Kaderbhai M A, Freedman R B. Biochim. Biophys. Acta., 1980 (601): 11
[144] Pryde G. Trends Biochem. Sci., 1986 (11): 160
[145] Hjelmeland L M, Nebet D W, Chrambach A. Anal. Biochem., 1979 (95): 201
[146] 郭尧君，“薄层电聚焦”在何忠效，张树政，郭尧君“等电聚焦”1985. 科学出版社. 81～93
[147] 郭尧君. 生物物理学报，1998 (4): 389～391
[148] Bjellqvist B, Sanchez J C, Pasquali C, et al. Electrophoresis, 1993 (14): 1375～1378
[149] Görg Postel W, Weser J, et al. Electrophoresis, 1987 (8): 88～91
[150] “Carbamylyte Calibration kit for 2D Electrophoresis” Instructions. Pharmacia AB, Uppsala, Sweden, 1990
[151] ünlü M, Morgan M E, Minden J S. Electrophoresis, 1997 (18): 2071～2077
[152] Alban A et al. Proteomics, 2003 (3): 36～44
[153] ünlü M. Biochem. Soc. Trans, 1999 (27): 547～549
[154] Tonge R et al. Proteomics, 2001 (1): 377～396
[155] Kubis. S, Baldwin A et. al. Plant Cell, 2003 (15): 1859～1871

[156] Seike M., Kondo T. et al. Cancer Res, 2003 (63): 4641~4647
[157] Sekhar K. R., Crooks P. A Cancer Res, 2003 (63): 5636~5645
[158] Heinemann F. S., Korza G. et al. J. Biol. Chem, 2003 (278): 42966~42975
[159] Somiari R . I. Sullivan A., et al. Proteomics, 2003 (3): 1863~1873
[160] Hoffert J. D. Van Balkom B. W et al. Am J. Physiol Renal Physiol, 2003 (286): 170~179
[161] Kondo T, Seike M. et al. Proteomics, 2003 (3): 1758~1766
[162] Gade D., Thiermann J. et al. J. Mol Microbiol Biotechrol, 2003 (5): 240~251
[163] Sakai J. Ishikawa H et al. Proteomics, 2003 (3): 1318~1324
[164] Knowles M. R. Cervino S. et al. Proteomics, 2003 (3): 1162~1171
[165] Shaw J. Rowlinson R. et al. Proteomics, 2003 (3): 1181~1195
[166] Borner G. H, Lilley K. S. et al. Plant Physiology, 2003 (132): 568~577
[167] Lee J R. Baxter T. M. et al. Applied Immuno histochemistry and Molecular Morphology, 2003 (11): 188~189
[168] Hamdan M. Righetti P. G. Mass Spectrometry Reviews, 2002 (21): 287~302
[169] Candas M. Loseva O. et al. Molecular and Cellular Proteomics, 2003 (2): 19~28
[170] Yokota H Hira moto M et al. Life Science News, 2002 (12): 3~5
[171] Zhou G. LI H. et al. Molecular and Cellular Proteomics, 2002 (1): 117~123
[172] Gharbi S. Gaffney P. et al. Molecular and Cellular Proteomics, 2002 (1): 91~98
[173] Ruepp S U. Tange R. P. Toxicol. Sci, 2002 (65): 135~150
[174] Skynner H Rosahl T. Proteomics, 2002 (2): 1018~1025
[175] Macdonald N. Chevalier S. et al. Arch. Toxicol, 2001 (75): 415~424
[176] Yan J. X. Devenish A. T., Proteomics, 2002 (2): 1682~1698
[177] Beaumont M. Currie I. et al. Life Science News, 2001 (7): 1~3
[178] Orange P. Hawkins E et al. Life Science News, 2000 (5): 1~4
[179] Ünlü M. Biochem Soc Trans, 1999 (27): 547~549
[180] Tonge R et al. Proteomics, 2001 (1): 377~396
[181] Gert Van den Bergh, Lutgarde Archens Current Opinion in Biotech nology, 2004 (15): 38~43
[182] Maeda K Finnie C et al. Biochem J, 2004 (378): 497~507
[183] Friedman D B Hill S et al. Proteomics, 2004 (3): 793~811
[184] Bell P. J., Karuso P. J. Am. Chem. Soc, 2003 (125): 9304~9305
[185] Mackintosh J. A. et al. Proteomics, 2003 (3): 2273~2288

第9章 滴定曲线

9.1 概 念

广义来说，滴定曲线（titration curve，简称 TC）也是一种双向技术。这个方法是 1976 年由 Rosengren 等首先提出，并随后在 1977 年发表[1]。原 LKB 公司和Bio-Rad公司先后将其制成电泳仪的附件。

滴定曲线是呈现样品中每个组分的迁移率对 pH 的曲线，为此先将含有载体两性电解质的凝胶进行等电聚焦。然后转 90°，加样，并使样品在垂直于 pH 梯度方向进行常规电泳。蛋白质分子此时根据环境的 pH 各自随着电场方向迁移，并根据它的电离基团改变电荷，结果就呈现了如图9.1 的曲线。如果样品是混合物,就呈现多条曲线。

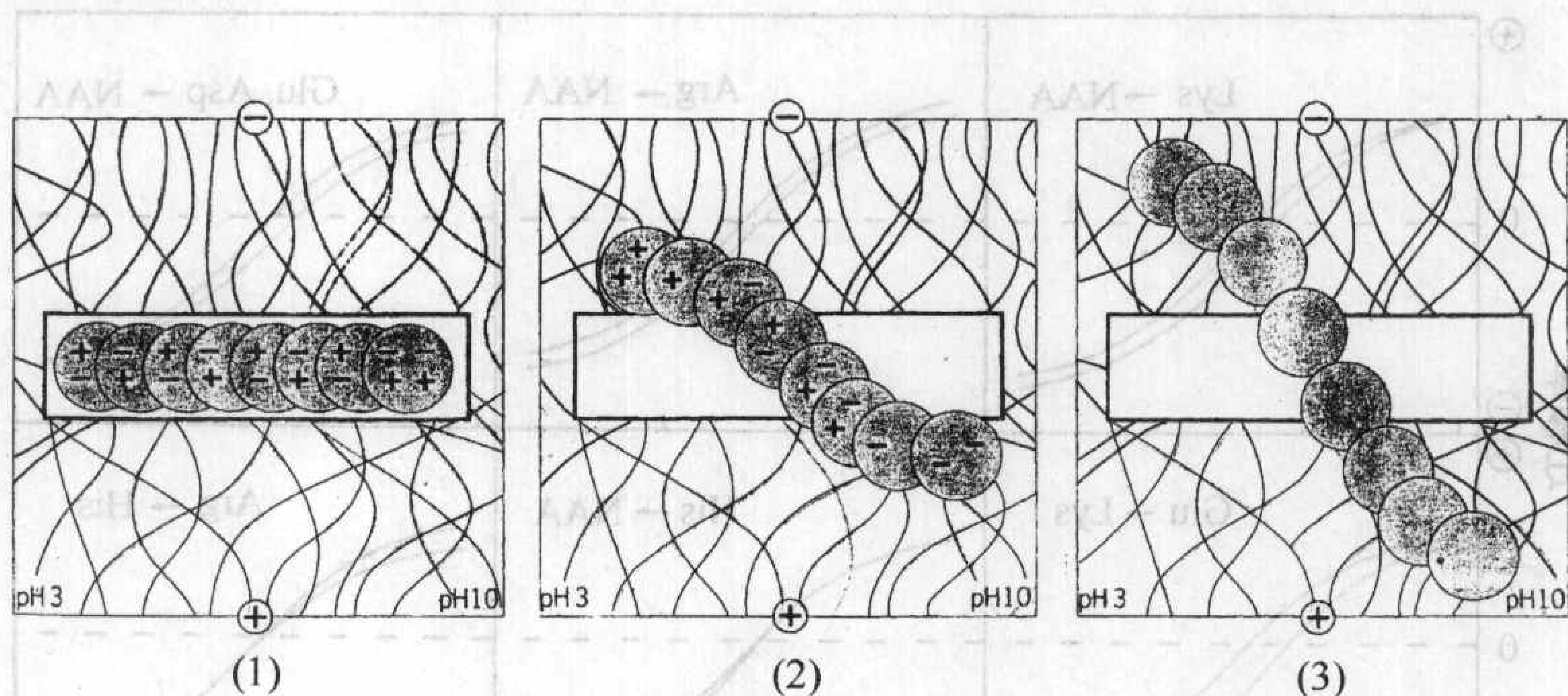


图9.1 滴定曲线的原理

（1）将含有载体两性电解质的凝胶进行等电聚焦，形成 pH 梯度，转 90°，加样；（2）将加有样品的等电聚焦凝胶进行常规电泳；（3）电泳结束

滴定曲线可以在一次实验中提供样品混合物的许多信息，如：

1）样品组分的稳定性、均一性、等电点（滴定曲线与加样孔的交叉点即为该组分的等电点）等[2]。如使用常规聚丙烯酰胺凝胶电泳，则需要在改变 pH 的一系列不同缓冲系统中进行许多次实验才能收集到这些信息。

2）与电荷有关的分析和制备纯化技术，如离子交换层析、等速电泳、常规聚丙烯酰胺凝胶电泳和等电聚焦的最佳 pH 条件[1]。

3）大分子-大分子相互作用。Righetti[3]用滴定曲线研究了 $Cytb_5$ 和 Met Hb 的相互作用。当两种蛋白各自在凝胶中电泳时，它们呈现经典的 S 型，但当混合在一起时，带型呈现很强的畸变。作为这个工作的延伸，Lostanlen 等[4]用直

接酶滴定曲线研究了 $Cytb_5$ 还原酶和 $Cytb_5$ 的相互作用。滴定曲线的直接检测可使用酶谱或免疫印迹[5]。

4）大分子－配体的相互作用。Krishnamoorthy 等[6]进行了 Met-Hb-inositol hexaphosphate（IHP）和 Met-Hb-inositol hexasulphate（IHS）混合物的滴定曲线实验。测得 Met-Hb-IHP 的稳定范围在 pH 4.5 ～6.0 。Met-Hb-IHS 的稳定范围在 pH 3.7 ～6.0 。Constants 等[7]证明了结合到人血清维生素 D-结合蛋白上的维生素 D_3 和它的衍生物会引起脱辅基蛋白的构象变化。由此可研究混合物的理想化学配比和测定全蛋白的稳定 pH 范围。

5）遗传突变体的揭示。对一个混合物中的蛋白质和它的基因突变体能形成"差示"滴定曲线。各自的滴定曲线形状揭示了带电的氨基酸突变体谱型的变化。如图9.2，在 Lys 突变体中，两条曲线在 pH 11 交叉，而 Glu 或 Asp 突变体的汇合点在 pH 3 左右。双电荷突变体（如 Lys→Glu）或相同电荷替代的突变体（如 Arg→His）也能被检测。这些理论的滴定曲线能用健康成人的 HbA 和某些突变体如 HbS、HbC 等混合而被实验性地改变[8,9]。

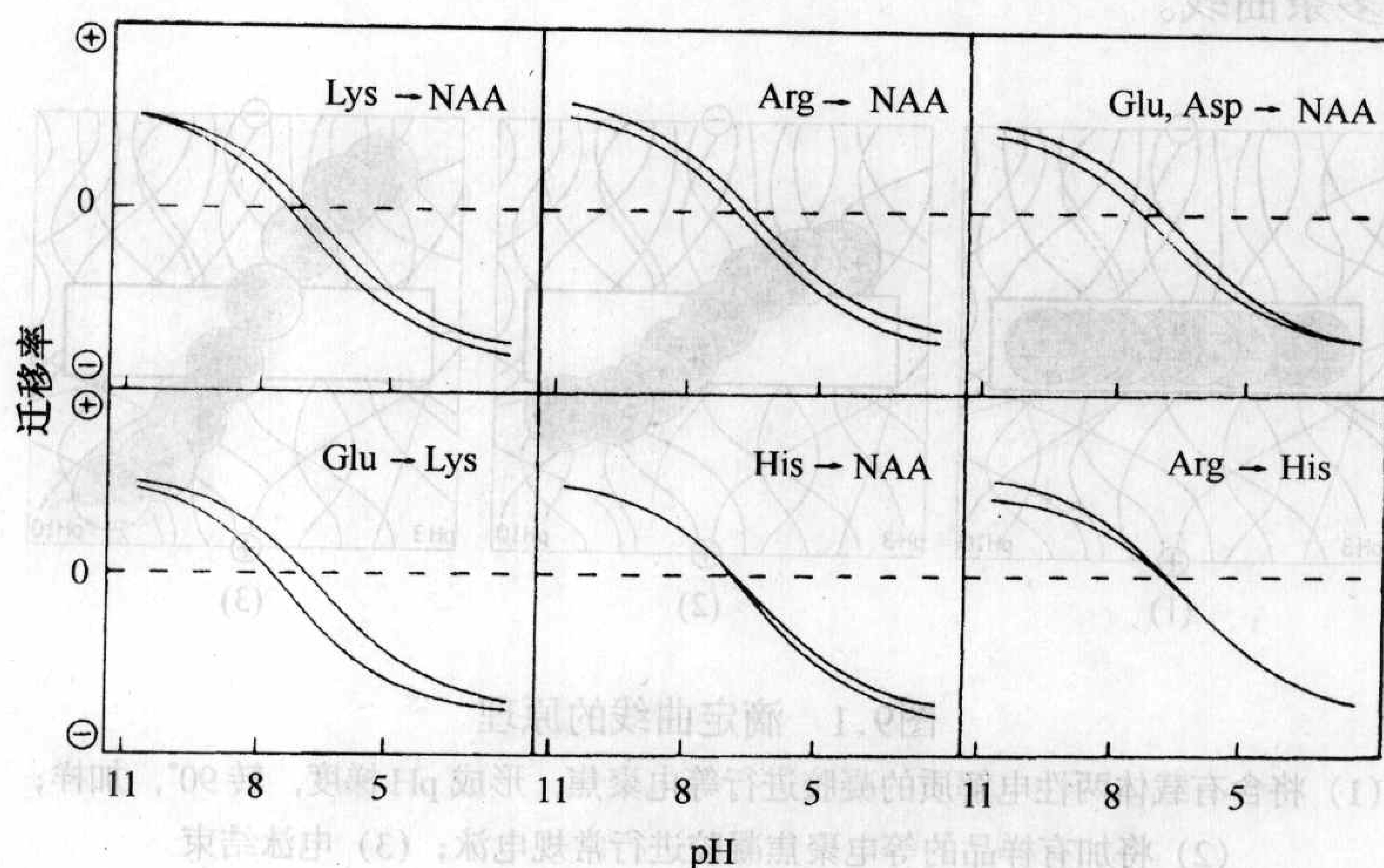


图 9.2　血红蛋白和它的遗传突变体在有氨基酸替代物时的理论滴定曲线。NAA：天然氨基酸。虚线表示零迁移率线[9]

6）解离 pK 值的直接测定。Righetti 等[10]和 Valentini 等[11]发展了一种数学理论，用于从 pH-迁移率曲线的形状中直接测定电离基团的 pK 值。对非两性离子，能通过测量相应于阳离子方向或阴离子方向的 1/2 迁移率的 $pH_{1/2}$来直接计算 $pK_{阳离子}$或 $pK_{阴离子}$。对两性物质，应在被测量离子的迁移率曲线上通过对相反电荷离子解离程度的影响来计算校正 $pH_{1/2}$值。

7）用亲和滴定曲线测定解离常数 K_d。pH-迁移率曲线的应用扩展之一是用亲和

滴定曲线[12]测定配体和蛋白的解离常数 K_d 以及它与 pH 的相互关系。如果配体是大分子，它可能简单地陷入凝胶介质。如果是小分子，则共价结合到凝胶纤维中。当配体摩尔浓度增加时，蛋白质的滴定曲线非常平缓，可用于计算在任何 pH 的 K_d 值[13,14]。滴定曲线对研究蛋白质分子的物理化学参数以及与配体相互作用的动力学参数有很重要的潜在价值。

8) 滴定曲线用于品种分析，食品分析能比等电聚焦技术得到更多的信息[15,16]。
9) 从等电聚焦的原理来说，样品加在靠近阳极或阴极并不会影响蛋白质分子的聚焦。但实际上对一些样品来说，加样位置会影响分辨率，甚至不聚焦，如图9.3 在不同加样位置的碳酸酐酶同工酶的聚焦谱是不同的。很长时间不能解释其原因。但从它的滴定曲线就不难明白这些同工酶中的大部分在等电点的 pH 附近有很陡的滴定曲线，所以聚焦得很好，并不受加样位置的影响。但有两条碱性的同工酶的滴定曲线（在图中用箭头标明）在酸性侧有较陡的滴定曲线，所以样品加在阳极侧，聚焦较好。但在碱性部分，滴定曲线非常平缓，所以聚焦带呈现扩散状[17,18]。

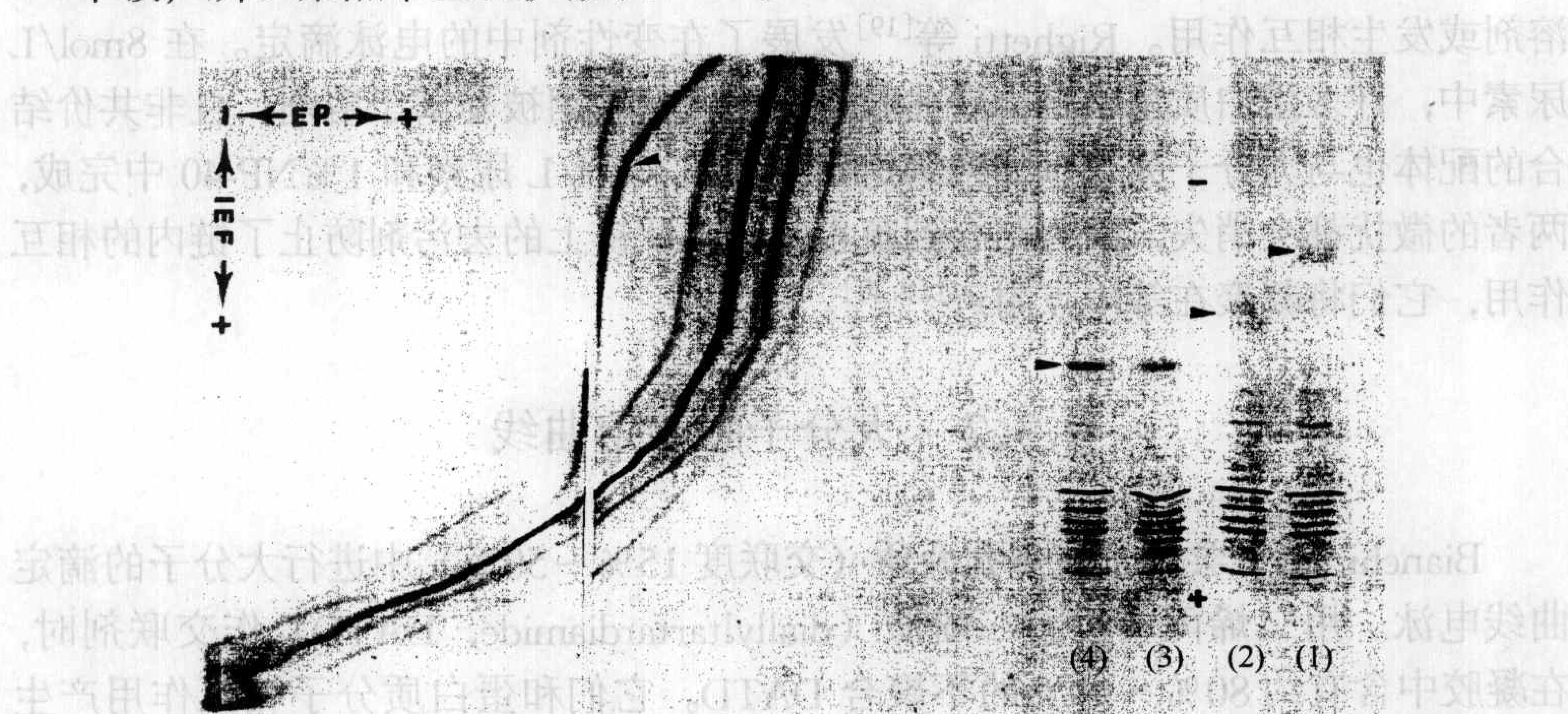


图 9.3　牛红细胞中碳酸酐酶的等电聚焦谱(右)和滴定曲线(左)pH 范围3.5～9.5[17,18]

(1)、(2) 样品加在阴极侧；(3)、(4) 样品加在阳极侧

9.2　方　　法

按第 6 章所述的方法配制 $T=5\%$，$C=3\%$的等电聚焦凝胶，并进行等电聚焦。为使在第二向电泳时，样品分子有强的电荷，以便在短时间内完成第二向电泳，保证滴定曲线的精确性以及为使样品有完整的滴定曲线，一般应选择宽 pH 范围（pH3.5 ～9.5 或pH3.5 ～10）。

第一向电泳结束后，切去电极条（电极条中的盐会干扰第二向电泳），将此

凝胶转 90°。在与加样孔平行的方向常规聚丙烯酰胺凝胶电泳用的电极条，（如进行半干电泳），加样，然后尽快进行第二向电泳，以免 pH 梯度扩散。在第二向电泳时可以用相对比较高的电压，电泳时间便大大缩短。

由于样品中的高盐和缓冲液离子在第二向电泳时的不均匀导电性会干扰结果，故应用透析或其他方法脱盐。

加样量取决于凝胶的大小、厚度、加样孔的大小和染色方法。如用考马斯亮蓝染色，5 倍于常规的量。

第二向电泳后，用表面电极测定 pH 梯度。染色方法也与前述几章相同。

9.3 实验考虑

9.3.1 在 8mol/L 尿素和去污剂中的滴定曲线

在天然条件下，不是所有的解离基团都能被直接滴定，只是表面基团能接近溶剂或发生相互作用。Righetti 等[19]发展了在变性剂中的电泳滴定。在 8mol/L 尿素中，许多蛋白质呈现自由卷曲状态，埋藏的基团被暴露于溶剂，且非共价结合的配体也与大分子分开。如果滴定曲线是在 8mol/L 尿素和 1% NP-40 中完成，两者的微扰都会消失，因为结合到疏水伸展多肽链上的去污剂防止了链内的相互作用，它们将凝聚在等电点附近[10,20]。

9.3.2 大分子的滴定曲线

Bianchi 等[21]尝试了在多孔介质（交联度 15%～50%）中进行大分子的滴定曲线电泳。用二烯丙基酒石二酰胺（diallyltartardiamide，DATD）作交联剂时，在凝胶中含有约 80%～90%的不聚合 DATD。它们和蛋白质分子相互作用产生发黏和可伸展的矩阵。用 40%～50%的甲叉双丙烯酰胺作为交联剂时，凝胶的疏水性太强，可接受的浓度约为 30%，此时比较稳定，并且允许大至 0.5×10^6Da 的球蛋白分子进行迁移。

9.3.3 用琼脂糖作为支持介质

作者曾参加 1993 年在挪威举行的国际电泳会议上由 Dr. Gabriel Peltre 主持的用琼脂糖作支持介质的滴定曲线电泳培训，方法十分简便。可用于分子质量>30 万的蛋白质滴定曲线的测定。第一向琼脂糖载体两性电解质 pH 梯度凝胶的灌胶和电泳方法参见 6.3.2 节，第二向常规琼脂糖电泳参见 9.2 节和 4.2.3.2 节。

参考文献

[1] Rosengren A, Bjellqvist B, Gasparic V. In: Electrofocusing and Isotachophoresis, Radola B. J. Graesslin D, eds. (de Gruyter, Berlin) 1977. 165～171

[2] Arnaud P, Gianazza F, Righetti P G, Funderberg H H. in Electrophoresis 1979 (Radola B. J, ed.) de Gruyter Berlin 1980. 151～163

[3] Righetti P G, Gacon G, Gianazza F, Lostanlen D, Kaplan J C. Biochem. Biophys. Res. Commun., 1978 (85): 1575～1581

[4] Lostanlen D, Gacon G, Kaplan J C. Eur. J. Biochem., 1980 (112): 179～183.

[5] Gianazza E, Righetti P G. In: Electrophoresis'79; Radola, B. J., ed. (de Gruyter, Berlin) 1980. 129～140

[6] Krishnamoorthy R, Bianchi Bosisio A, Labie D, Righetti P G. FEBS Lett., 1978 (94): 319～323

[7] Constans J, Viau M, Gouaillard C, Bouisson C, Clerc A. In: Electrophoresis'79; Radola, B. J., ed (de Gruyter, Berlin) 1980 . 701～710

[8] Righetti P G, Krishnamoorthy, R, Gianazza E, Labie, D. J. Chromatogr, 1978 (166): 455～460

[9] Righetti P G, Gianazza E. Prot. Biol. Fluids., 1979 (27): 711～714

[10] Righetti P G, Menozzi M, Gianazza E, Valentini L. FEBS Lett., 1979 (101): 51～55

[11] Valentini L, Gianazza E, Righetti P G. J. Biochem. Biophys. Methods, 1980 (3): 323～338

[12] Horejsi V. J. Chromatogr., 1979 (178): 1～13

[13] Ek K, Righetti P G. Electrophoresis, 1980 (1): 137～140

[14] Ek K, Gianazza E, Righetti P G. Biochim. Biophys. Acta., 1980 (626): 356～365

[15] Rehbein H. Electrophoresis, 1995 (16): 820～822

[16] Cade-Treyer, Cade A, Darjo A et al. Electrophoresis, 1996 (17): 479～482

[17] Ek K. LKB Application Note No. 319, June, 1981

[18] Righetti P G, Isoelectric focusing: theory, methodology and applications, Elsevier Biomedical Press. 1983, 266～267

[19] Righetti P G, Krishnamoorthy R, Lapoumeroulie C, Labie D. J. Chromatogr, 1979 (177): 219～225

[20] Righetti P G, Gianazza E. In: Electrophoresis '79; Radola, B. J., ed. (de Gruyter, Berlin) 1980. 23～38

[21] Bianchi A, Loehrlein C, Snyder R S, Righetti PG. J. Chromatogr, 1980 (189): 317～330

第10章 免疫电泳

免疫电泳（immunoelectrophoresis）技术是基于抗原的电泳迁移以及与抗体的专一性免疫亲和或沉淀反应来鉴定其强度和特异性。在大部分电泳中，样品中的抗原通过含有相应抗体的 pH 8.6 的薄层琼脂糖凝胶，抗原在 pH 8.6 时通常带强负电，与在含有抗体的凝胶中电泳时发生免疫反应。最初抗原过量，所以仅仅产生可溶性的免疫混合物，与抗原一起向阳极迁移。当抗原和抗体的浓度达到等价点（equivalence point）时就形成大的、不溶性的免疫沉淀。各种免疫电泳沉淀的形状不同，大部分是锥体状或火箭状，座落于样品孔上。见图10.1 锥体（或火箭或其他形状的沉淀）的高度或面积与样品中抗原的量成正比。

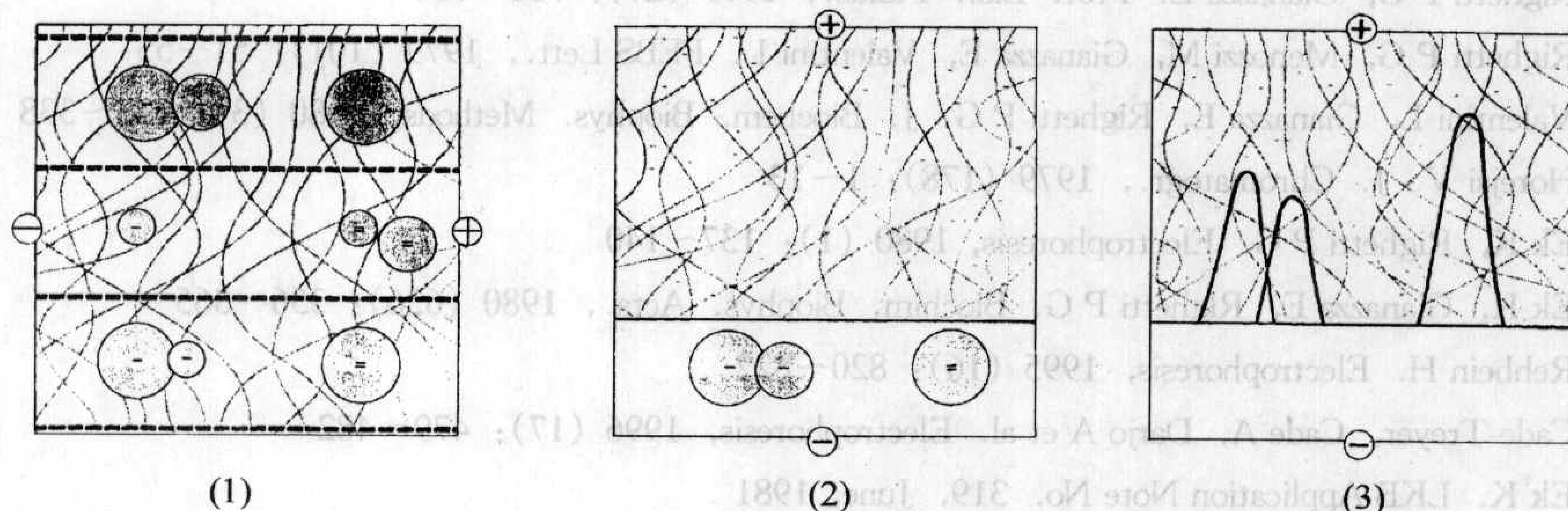


图10.1 免疫电泳

(1) 抗原在不含抗体的凝胶中先分离；(2) 将凝胶条放在含有抗体的凝胶中，以直角方向电泳；(3) 沉淀峰形成

免疫分析的最大应用领域是人血蛋白的研究。许多疾病都是由于血液中一种或多种蛋白浓度或结构的改变所致。一些体液如：脑脊液、乳汁、肠液、唾液、腹水、胸膜液等，虽然其中蛋白含量很少，也能用免疫电泳方法测定。体外蛋白，如疾病产生的有机物质，也是研究的对象。在农业，食品，法医学研究中，主要用于不同来源蛋白质的比较，即分类学研究。在基础研究工作中，由于抗原-抗体的反应的高度专一性，例如凝胶过滤后收集的蛋白成份纯度的测定，蛋白-蛋白，蛋白-配体相互作用的研究都能使用免疫电泳技术[1,2]。

10.1 原　　理

10.1.1 免疫电泳基础

如果一种外来物质，如一种蛋白质、一种细菌或一种病毒进入到动物组织

中，动物将产生抗体来对付这种外来物质。这种外来物质被称为抗原。它可以被注射到动物中以产生抗体。当抗体的浓度达到预定值时，从被注射的动物体内抽血，除去红细胞后即为抗血清，其中含有抗体。产生抗体的抗原与这些抗体有专一性反应。这种专一性反应是免疫方法的基础，可用于抗原和抗体的定性和定量分析。

抗体是一类蛋白，叫做免疫球蛋白，它在白细胞中产生。每一个免疫球蛋白分子由 4 个多肽链组成，两个轻链和两个重链。专门与抗原结合的抗体部分称为结合部位。每一个抗体有两个结合部位，能与一个或两个抗原分子结合。与抗体分子结合的抗原部分称为抗原决定簇（antigenic determinant）。一个抗原能有一个、二个、三个甚至多个抗原决定簇。每一个抗原决定簇专一性地结合在不同的抗体结合部位。抗原分子在抗体分子之间起着“桥”的作用，并在抗原和抗体之间形成链或网。此网（通常称为免疫沉淀）的信息即为免疫分析技术基础。

10.1.2　单免疫扩散-Mancini 技术

这是最简单的免疫技术，但可用于单抗原的定量测定，如图10.2：

1）抗原样品被放在含有单特异性抗体的薄层琼脂糖凝胶的孔中，琼脂糖凝胶板被放置 24 小时以上，让凝胶扩散。
2）抗原分子扩散到凝胶中和抗体结合，形成可溶性的复合物。
3）扩散的抗原浓度与凝胶中的抗体浓度达到等价点时，在孔的周围形成一个沉淀圈。
4）圈的面积与抗原的量成正比，比较已知和未知抗原浓度产生的圈的面积，就能测出未知抗原的浓度。这个技术特别适合于免疫球蛋白的测定。

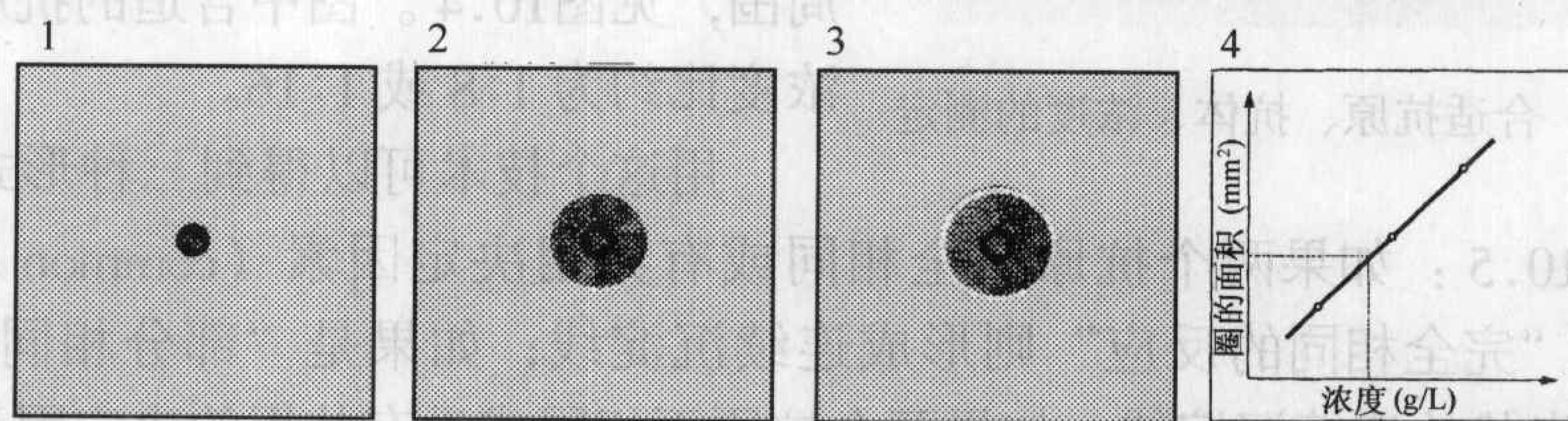


图 10.2　单免疫扩散——Mancini 技术[3]

10.1.3　双扩散-Ouchterlony 技术

虽然这不是免疫电泳技术，但它可用于样品复合物的最初研究和用于测定产生免疫沉淀的正确的抗原-抗体的浓度。如图10.3：

1）在琼脂糖凝胶板上打三个孔，在上面的孔中放抗原样品，在下面的孔中放含有抗体的抗血清以测定所有的抗原；
2）抗原和抗体在凝胶中扩散；
3）扩散的抗原和抗体的浓度达到等价点时形成沉淀直线。如果抗原-抗体的浓度合适，沉淀线在两孔的中间。如果抗体过量，沉淀线靠近抗原孔。如果抗原过量，沉淀线靠近抗体孔。

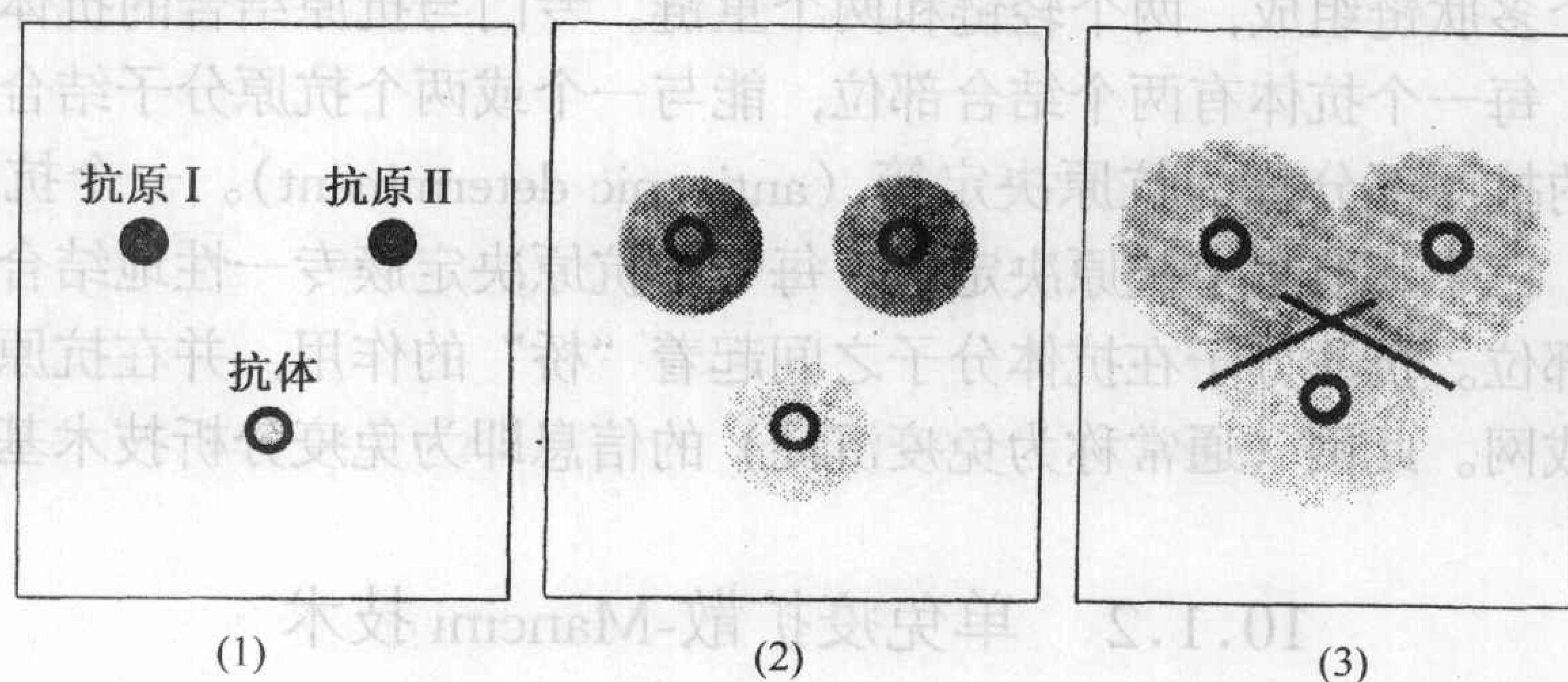


图 10.3　双扩散-Ouchterlony 技术[4]

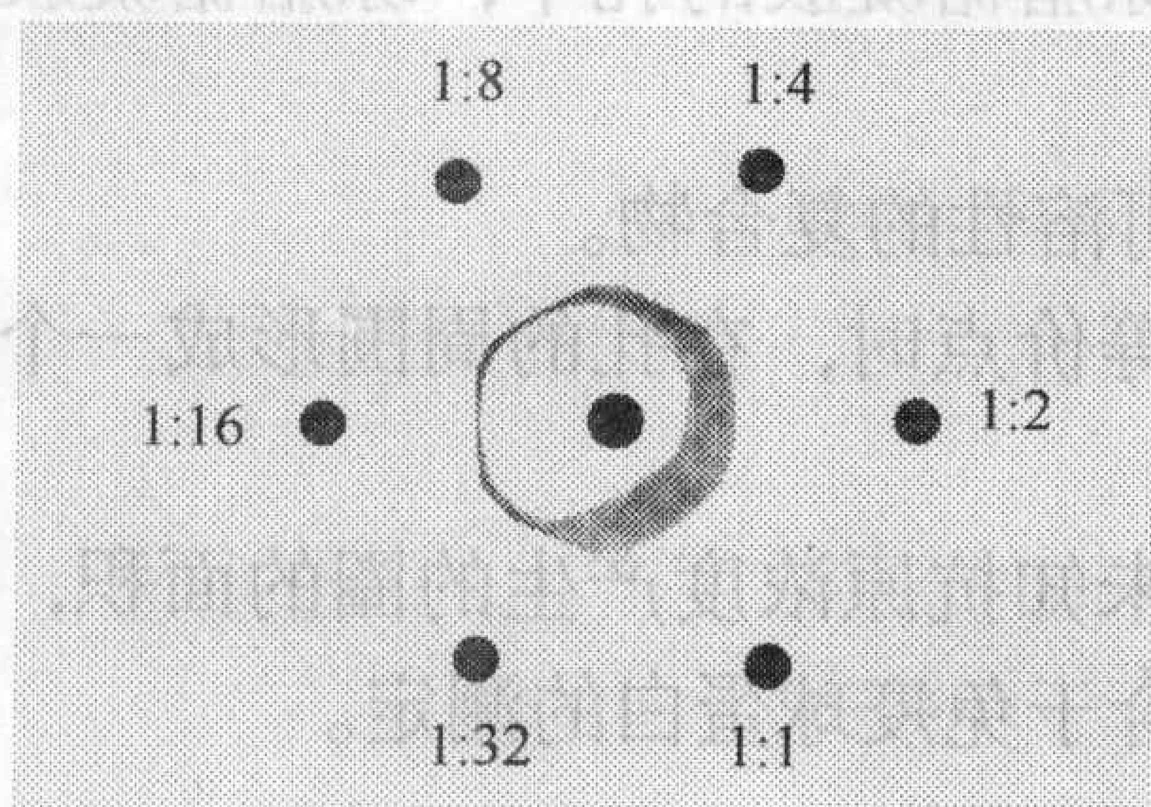


图 10.4　合适抗原、抗体、浓度的测定

用双扩散技术作定量目的时，应使用合适的沉淀条件。如抗原或抗体大大过量，由于溶解作用的改变和重新沉淀，可能产生沉淀迁移或多种沉淀物。为了研究合适的抗原和抗体浓度，将抗血清放在中间孔中，一系列稀释的抗原放在中心孔的周围，见图10.4。图中合适的抗原和抗体浓度比约为1:8或1:16。

用这个技术可以得到三种形式的沉淀线，如图10.5：如果两个抗原完全相同或有共用决定因素（common dleterminants）即“完全相同的反应”则形成连续沉淀线；如果是“部分相同的反应”则形成锯齿状的连续沉淀线；如果两个抗原不相同或没有共用的决定因素即“不

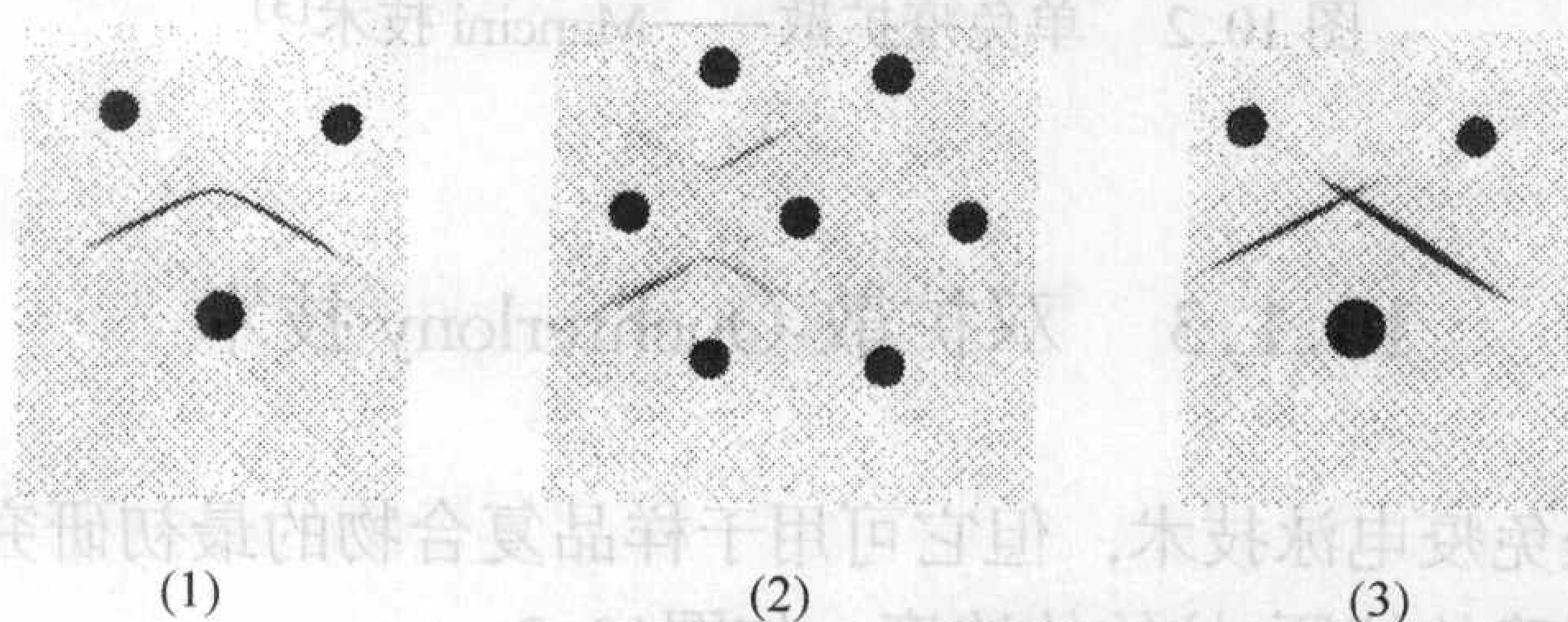


图 10.5　三种形式的沉淀线

相同反应”则形成两条相互交叉的沉淀线。

10.1.4 Grabar 和 Williams 免疫电泳

这是一种经典的免疫电泳技术，用于在复杂混合物中检测一种或几种抗原。

1）样品放在琼脂糖凝胶的孔中，在电场下分离，如图10.6。

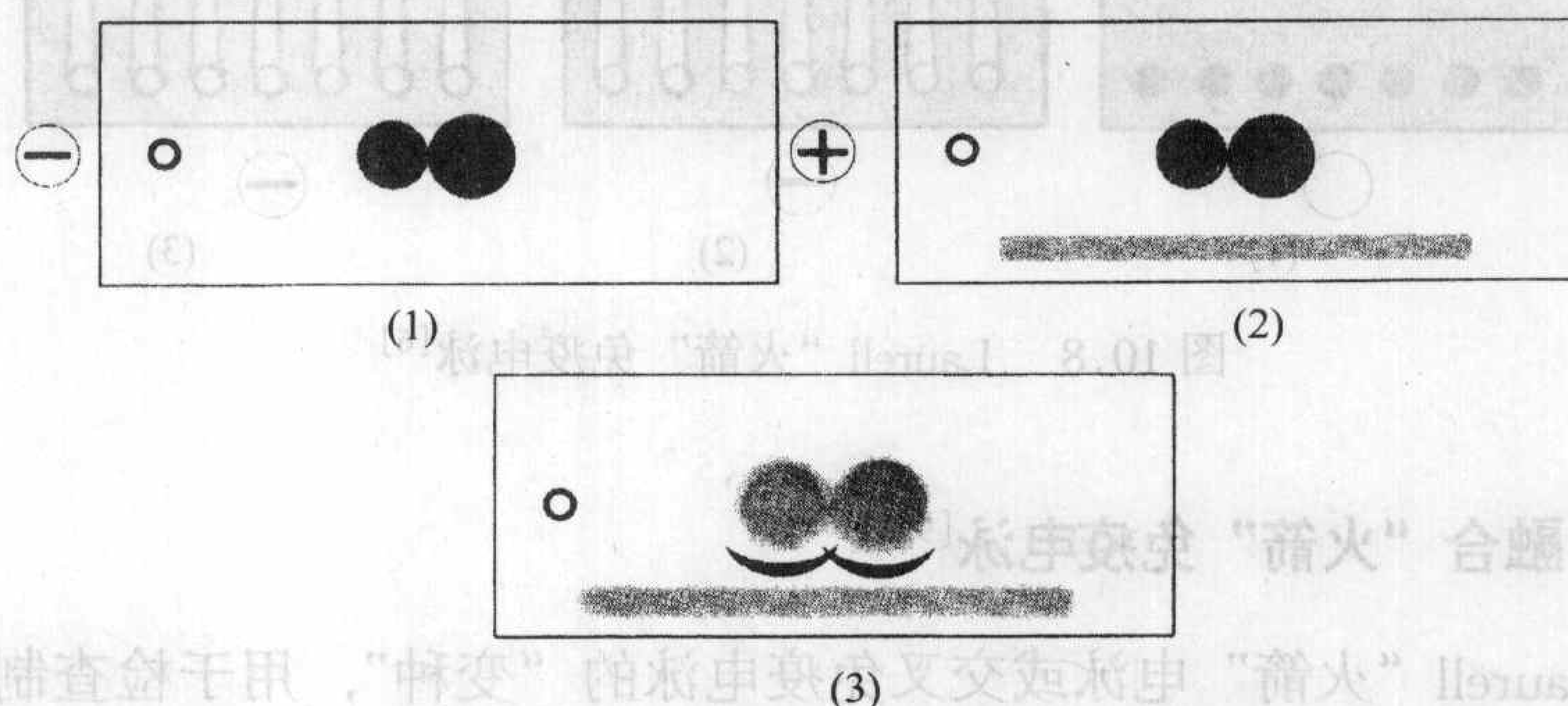


图 10.6 Grabar 和 Williams 的免疫电泳[5]

2）抗血清放在与迁移方向平行的凝胶的凹槽中，让凝胶中的抗原和抗体分子扩散10～20 小时；

3）抗原和相应的抗体结合时，形成弧形沉淀线。图 10.7 为不同浓度人血清的 Grabar 和 Williams 免疫电泳的结果。

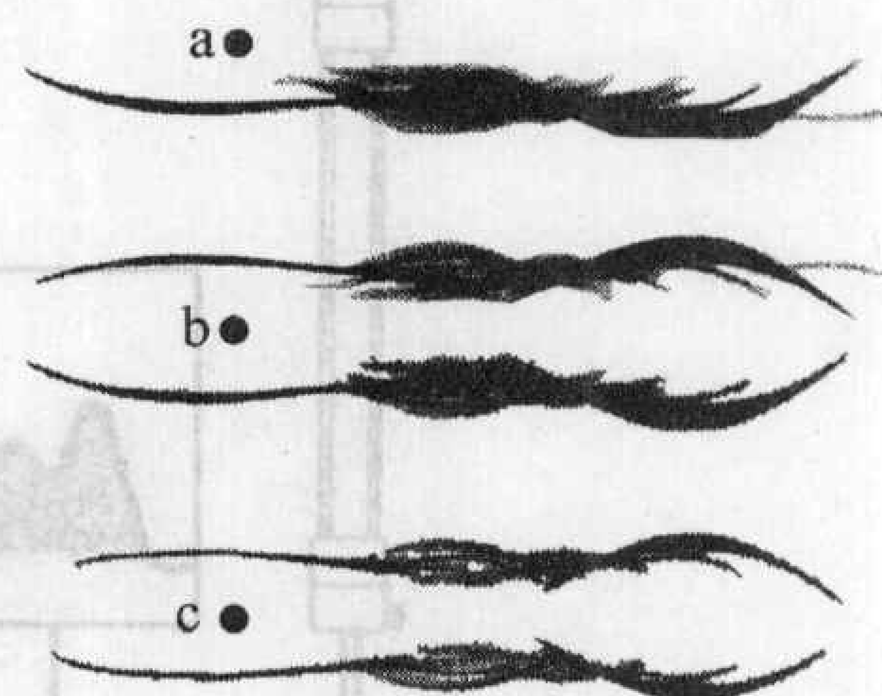


图 10.7 不同浓度人血清的 Grabar 和 Williams 免疫电泳[5]

10.1.5 “火箭”免疫电泳

10.1.5.1 Laurell “火箭” 免疫电泳[6]

这是用于测定单个抗原浓度的简单、快速和具有重复性的技术[7,8]，见图10.8：

1）抗原样品放在含有单专一性抗体的凝胶的孔中，凝胶用 pH 8.6 配制，因为抗体在这个 pH 的净电荷为零，在电场下不迁移；

2）抗原分子在电场下迁移，最初形成可溶性复合物，接着沿着迁移抗原区的边缘从底部开始形成沉淀网。

3）当所有的抗原被沉淀时，形成“火箭”。“火箭”的高度与所加抗原的量大致成比例。

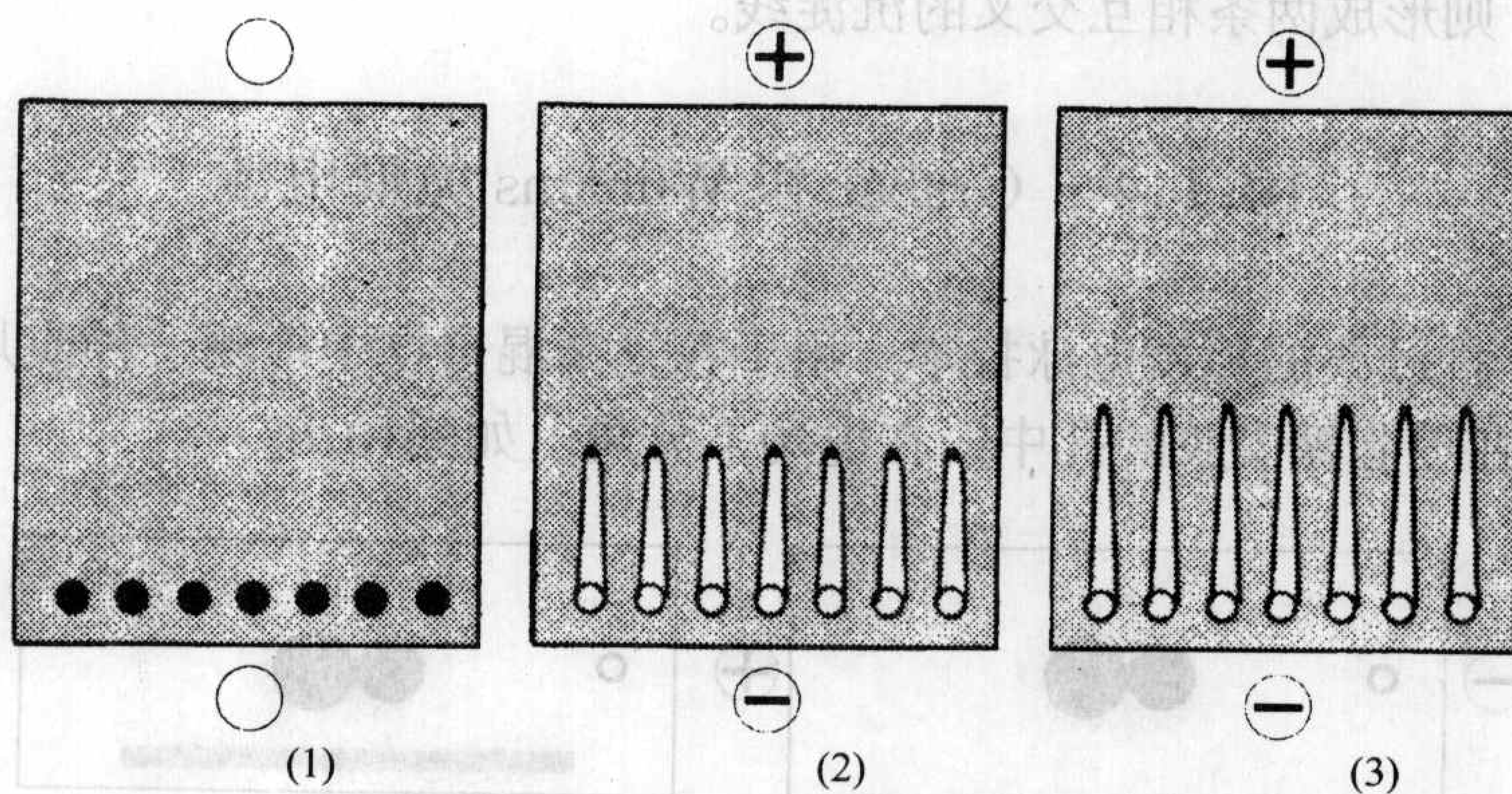


图 10.8 Laurell “火箭” 免疫电泳[6]

10.1.5.2 融合“火箭”免疫电泳[9]

这是 Laurell “火箭” 电泳或交叉免疫电泳的 “变种”，用于检查制备后收集组分的纯度，是产品质量控制的有效方法[10]，见图10.9：

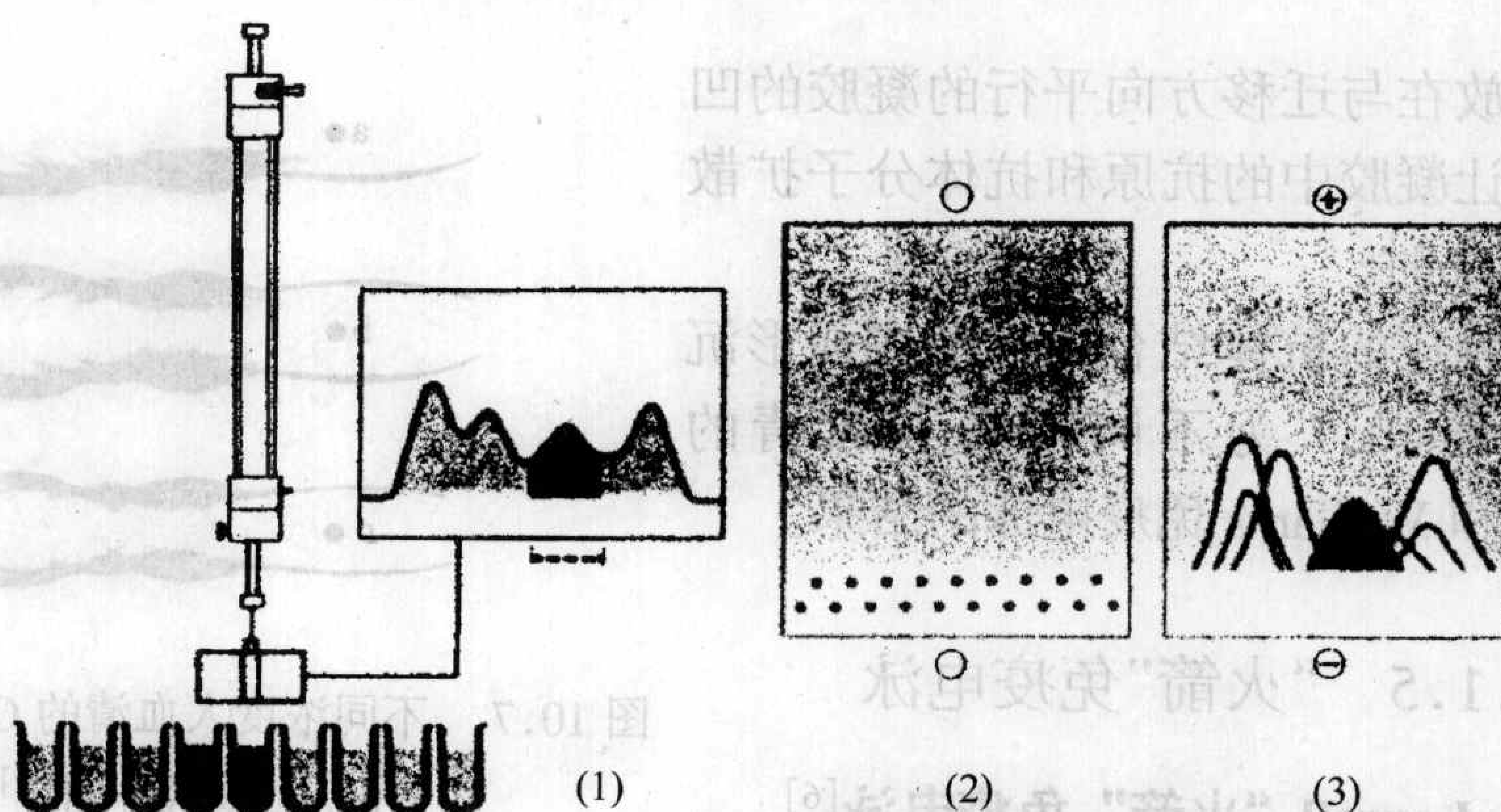


图 10.9 融合 “火箭” 免疫电泳[9]

1）收集层析或制备电泳分离后的组分；
2）在不含抗体的琼脂糖凝胶中打两排成锯齿状的孔，按收集的峰次序放在孔中让其扩散。然后再把包括孔的凝胶条去掉，重新放上含有抗体的凝胶条；
3）在两排孔的直角方向进行免疫电泳。每一种蛋白有一条沉淀线，根据沉淀峰的数目可以检测所收集组分的纯度。

10.1.6 交叉免疫电泳

10.1.6.1 Clarke 和 Freeman 交叉免疫电泳[11]

这是电泳和半定量免疫电泳的有效结合。见图10.10：

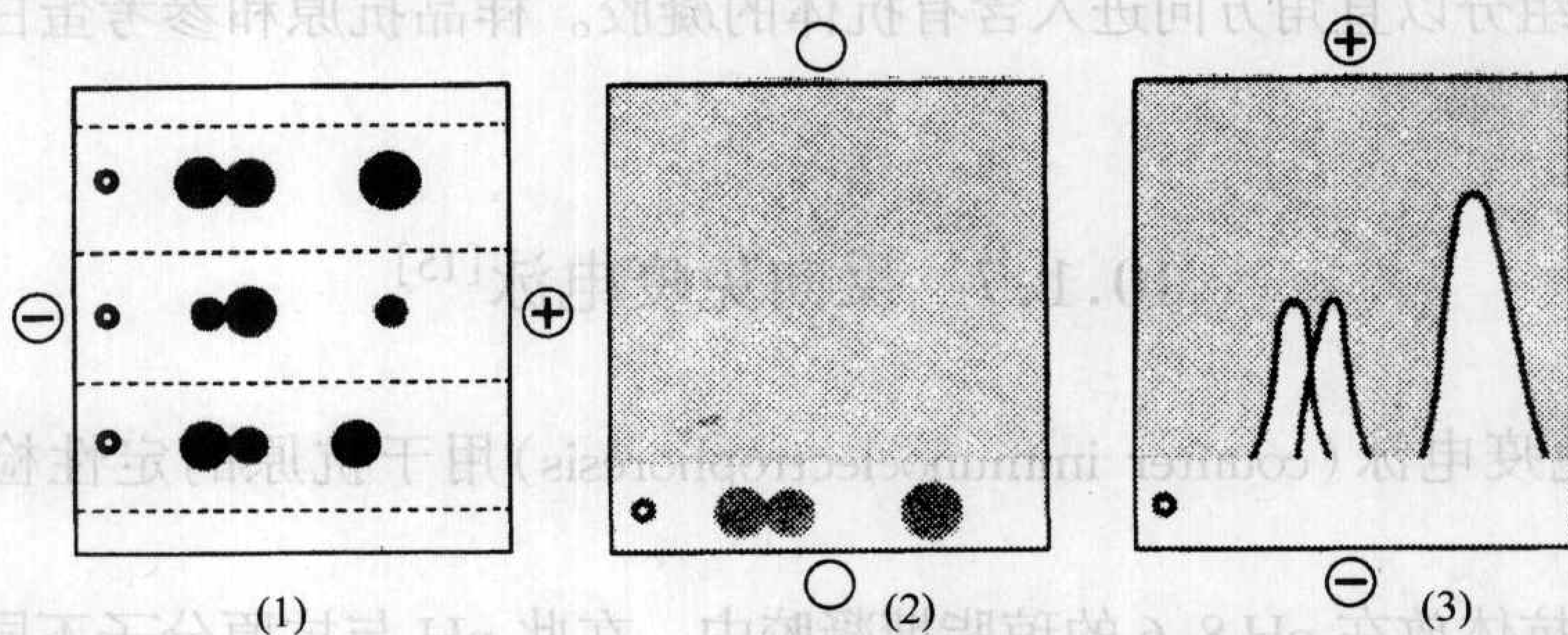


图 10.10 Clarke 和 Freeman 交叉免疫电泳[11]

1）先在不含抗体的琼脂糖凝胶中分离抗原；
2）凝胶被切成含有分离样品的条并灌制含有相应抗体的凝胶；
3）抗原在含有抗体的凝胶的直角方向进行第二向电泳。当抗原和抗体的浓度达到等价点时，与“Laurell”火箭电泳一样形成火箭峰。每个峰的面积与抗原的量成正比。人血清的交叉免疫电泳约有 50～70 个沉淀峰，说明这种电泳方法的分辨率是很高的[12,13]，见图10.11 。

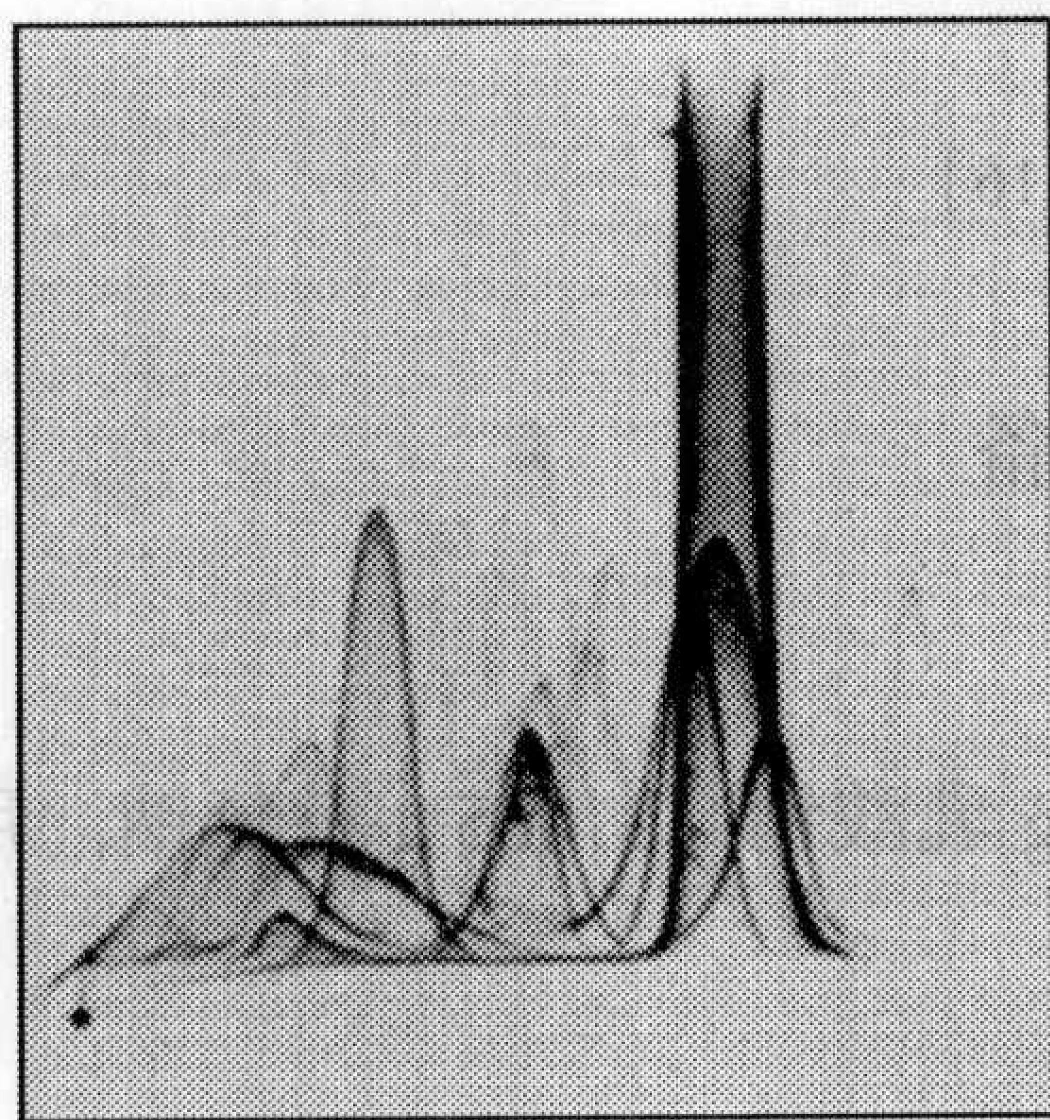


图 10.11 人血清的 Clark 和 Freeman 交叉免疫电泳[11]

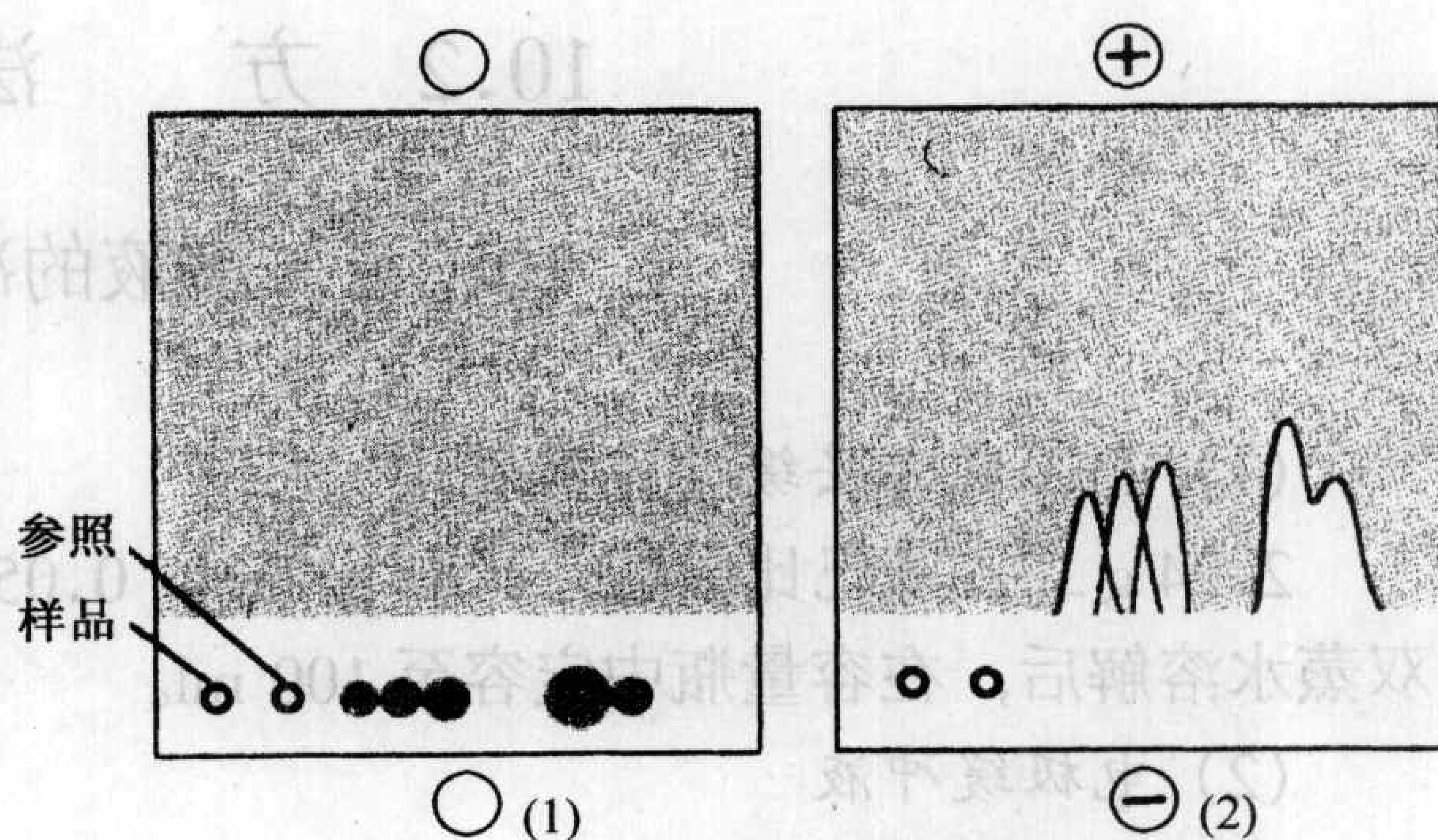


图 10.12 串联交叉免疫电泳[14]

10.1.6.2　串联交叉免疫电泳[14]

为了鉴别样品中的组分，可在样品旁加一个纯参考蛋白来进行比较，见图10.12。

1）抗原样品和参考蛋白放在邻近的孔中，它们在凝胶中以相同速度迁移；

2）分离的组分以直角方向进入含有抗体的凝胶。样品抗原和参考蛋白形成一个融合的双峰。

10.1.7　反向免疫电泳[15]

反向免疫电泳（counter immunoelectrophoresis）用于抗原的定性检测。如图10.13。

1）抗原和抗体放在 pH 8.6 的琼脂糖凝胶中，在此 pH 与抗原分子不同，抗体分子只有很低的迁移率；

2）加电场后，抗原和抗体分子互相向对方迁移，但抗体不是由于电泳迁移，而是由于琼脂糖凝胶中的电荷引起的电内渗导致的迁移；

3）在等量点时形成沉淀。

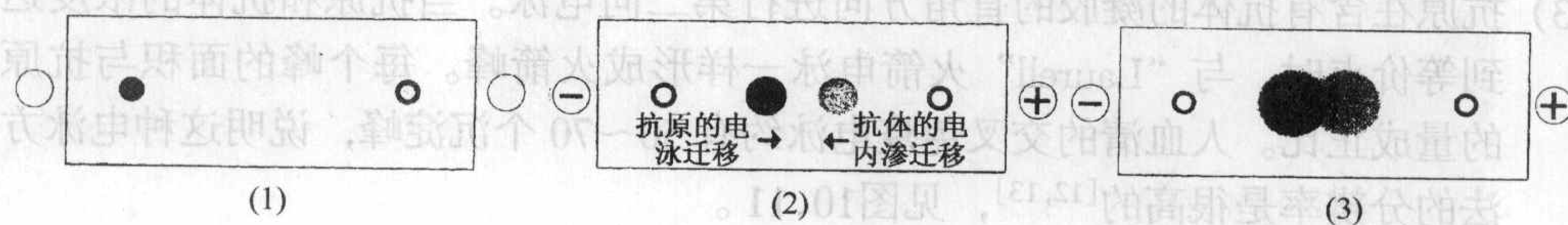


图 10.13　反向免疫电泳[15]

10.2　方　　法[16]

10.2.1　溶液的准备

（1）Tris-巴比妥缓冲液贮液

2.24 g 二乙基巴比妥酸，4.43 g Tris，0.053 g 乳酸钙，0.065 g 叠氮钠，用双蒸水溶解后，在容量瓶中定容至 100 ml。

（2）电极缓冲液

用双蒸水稀释 4 倍。

（3）1％琼脂糖溶液

选择合适电内渗的琼脂糖，为避免它水化时成团，常将琼脂糖粉撒在上述配制的缓冲液上，煮沸溶解，在 90℃ 水浴上加热，搅拌，直至溶液转为透明。琼

脂糖溶液可在4℃贮存几个月，使用前再在90℃水浴上加热溶解。

如果在凝胶溶液中需加抗体，必须在凝胶溶液被冷至55℃后再加，随后立即灌注。

10.2.2 倒　　胶

为使琼脂糖溶液均匀铺层和得到重复的结果，玻璃板必须水平放置。

为便于在免疫电泳中从第一向到第二向的转移，最好使用琼脂糖凝胶支持膜。12 ml 琼脂糖溶液在84cm×94cm上的凝胶厚度为1.5 mm。倒胶后约3分钟凝固。待其冷却到室温后，把它放在保湿盒中，使用前在冰箱中放1小时，这样可以使凝胶强度增加，防止凝胶破碎。

10.2.3 打孔与加样

打孔器直径可为2.0 mm、2.5 mm、4.0 mm，相应于1.5 mm厚度凝胶的样品体积为2μl、5μl和10μl。

最佳加样量为1～15μl。加样时，针要插入孔中的所有方向，以防止空气在加样孔中的"座垫"作用而使样品溢出凝胶表面。

10.2.4 电　　泳

电泳时温度可控制在10～15℃，同前述电泳的方法一样，先在冷却板上铺一层煤油，再铺胶。电极芯与凝胶的边缘接触5～10mm，并保持平行，电泳时的电场强度约为20V/cm。

10.2.5 检　　测

如用考马斯亮蓝染色，先用生理盐水洗去没有反应的蛋白。为了加速染色步骤，将凝胶压干。(将凝胶放在玻璃板上，先用蒸馏水湿润。在小孔中注入双蒸水，以防止凝胶压扁时，小孔中的空气使凝胶破裂。用一张湿滤纸和5张干滤纸盖在上面。再在上面放一块玻璃板和压1kg重物。3分钟后，用5张干滤纸换上面5张湿滤纸，重复两次这样的过程，小心地除去所有的滤纸。）用0.1 mol/L氯化钠溶液洗20分钟两次，重复两次上述压胶的过程，用热或冷风吹干。将凝胶放在染色液中染5分钟，用水淋洗，再脱色。（脱色液：180ml 95%乙醇＋40ml冰醋酸＋180ml蒸馏水。染色液：1g考马斯亮蓝R250溶于200ml脱色液中，溶液可以使用几次。）

10.3 实验考虑

10.3.1 支持介质

虽然免疫分析也可在自由溶液中完成，如比浊/散射浊度免疫检测（turbidimetric/nephelometric immunoassays）[17]，但免疫电泳一般都使用琼脂糖凝胶作支持介质。因为琼脂糖凝胶与生物大分子只有很小的结合，且它有很大的孔径允许大的免疫球蛋白分子迁移。1%的琼脂糖凝胶可允许高至2百万的大分子通过[18]。

如第2章所述，琼脂糖凝胶的电内渗对电泳的影响是必须考虑的。中等电内渗的凝胶（m_r 约为 -0.13）适用于当前各种免疫电泳技术。Grabar 和 Williams 反向免疫电泳可使用高电内渗琼脂糖（m_r 约为 -0.25）[19, 20]。与别的电泳技术结合，如交叉免疫电泳应该用低电内渗琼脂糖（m_r 约为 -0.02）。

10.3.2 缓冲系统

在免疫电泳中最通常使用的缓冲系统是5, 5-二乙基巴比妥（佛罗那，veronal）。这个缓冲液适合在pH6.5～8.2之间的任何免疫反应[9, 14, 21]。在交叉免疫电泳中，第一向和第二向之间较好的相关性是在pH8.6，且高浓度的佛罗那在此pH易被溶解，所以pH8.6被广泛使用。在pH8.6巴比妥缓冲液中，常用Tris作为平衡离子，以保持系统的缓冲能力（二乙基巴比妥的pK为7.34，远离pH8.6）。

在缓冲系统中常使用一些添加剂，叠代钠通常用1g/L（15mmol/L），以防止系统中微生物的生长。表面活性剂如SDS[22]和Triton[23]被用于疏水蛋白和膜蛋白的研究。在交叉免疫电泳中从第一向转向第二向时必须除去样品中的SDS[24]。

钙离子对免疫电泳缓冲系统是非常重要的。钙离子的存在使许多抗原-抗体系统的沉淀线变得细窄[6]。在一向电泳中，钙离子会影响许多蛋白质对二价阳离子的亲和作用而使沉淀线的粗细和相对迁移率发生很大的变化。在原Pharmacia-LKB公司的pH8.6 Tris-巴比妥缓冲液中就含有0.5mmol/L乳酸钙。

10.3.3 抗体和抗血清

抗体通常被混合在60℃以下的琼脂糖凝胶中。为了得到凝胶中抗体的正确滴定度，应使用抗体供应商推荐的抗体溶液的体积和样品的稀释比例作为标准血

清测定值。因为沉淀峰的面积和抗体的滴定度成反比，使用较低的抗体滴定度将增加面积测量的灵敏度，但它减弱了沉淀线的可见度，这是一个矛盾。

因为在含有抗体的凝胶中电泳后，没有被沉淀的抗体也会被迁移出凝胶，所以可用抗血清代替纯抗体。但在抗体溶液中非沉淀蛋白质的存在能与别的方式与抗原相互作用，这能通过下述的媒介凝胶技术检测到，应设法除去这种影响[25]。

10.3.4　方法的选择

不同的免疫电泳方法适用于不同的目的和不同的领域。原则上可分为定性和定量两大类。Ouchterlony 双免疫扩散技术与 Grabar 和 William 免疫电泳技术一般用于定性分析。Mancini 单免疫扩散技术则可用作定量分析。但扩散技术需要较长的时间。如使用单专一性抗血清，Laurell“火箭”电泳可用于测定抗原的浓度，电泳速度则大大提高。如使用多专一性抗血清，则可用交叉免疫电泳，它是定性和定量方法的结合。Bjerrum 等[26]和 Solum 等[27]用交叉免疫电泳分别研究配体和蛋白的疏水相互作用和膜受体的检测，在技术上都有很大的进展。

融合“火箭”免疫电泳可用于检查从柱层析得到的收集物的纯度。

10.3.5　“Laying-on”技术[28]

这是将在琼脂糖凝胶或别的介质中分离的抗原（第一向电泳）转移到第二向琼脂糖凝胶中的一种简单和常规方法，常用于交叉免疫电泳。它是将含有分离抗原的聚丙烯酰胺凝胶条或醋酸纤维素膜电泳条倒扣在不含抗体的琼脂糖凝胶上，再在含有抗体的琼脂糖凝胶上以直角方向电泳，如图10.14 。如第一向电泳采用高分辨的等电聚焦，可以同时测定等电点和在复杂混合物中识别各种蛋白质[28]。

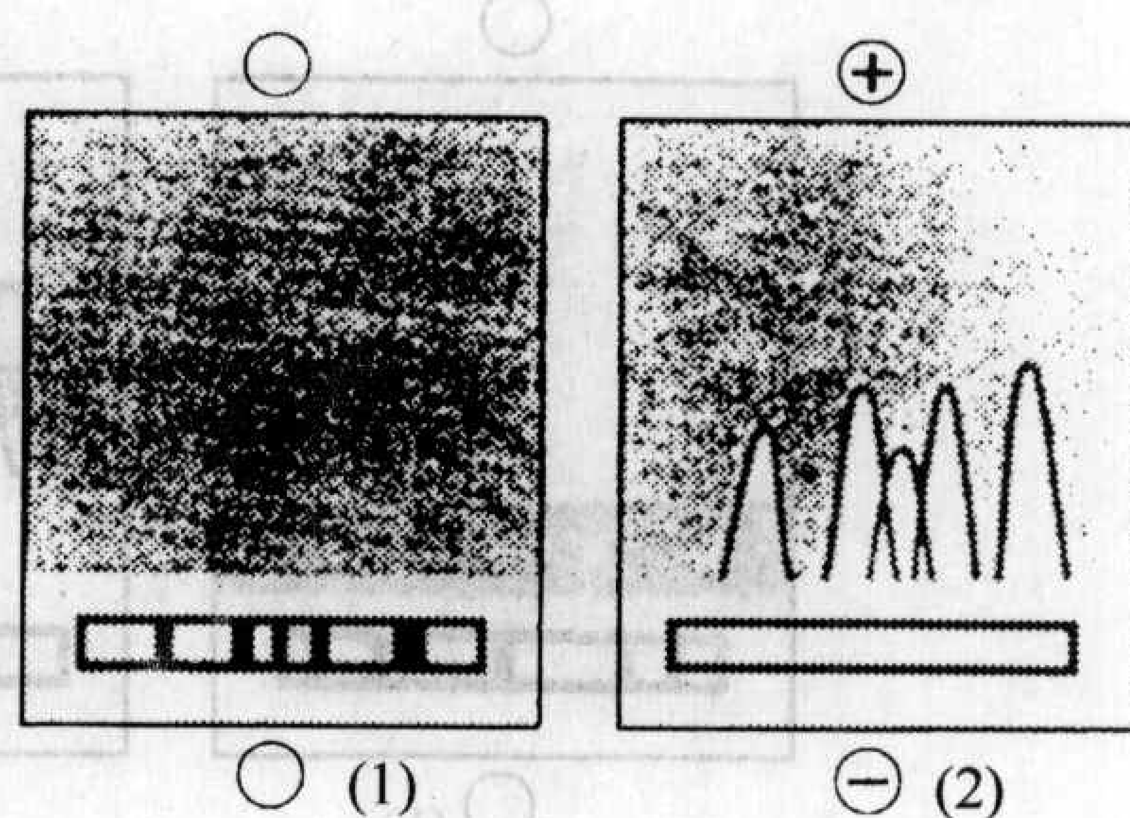


图 10.14　“Laying-on ”技术[28]

10.3.6　媒介凝胶技术

媒介凝胶技术（intermediate gel technique）用于在复杂混合物中鉴别抗原[29]。它能和交叉免疫电泳、融合“火箭”免疫电泳和“Laying-on”技术一起使用。在媒介凝胶中含有能专门识别抗原的抗体。如图10.15：

1）将载有抗原的胶条扣在不含抗体的琼脂糖凝胶上，接着上述凝胶再铺一定宽

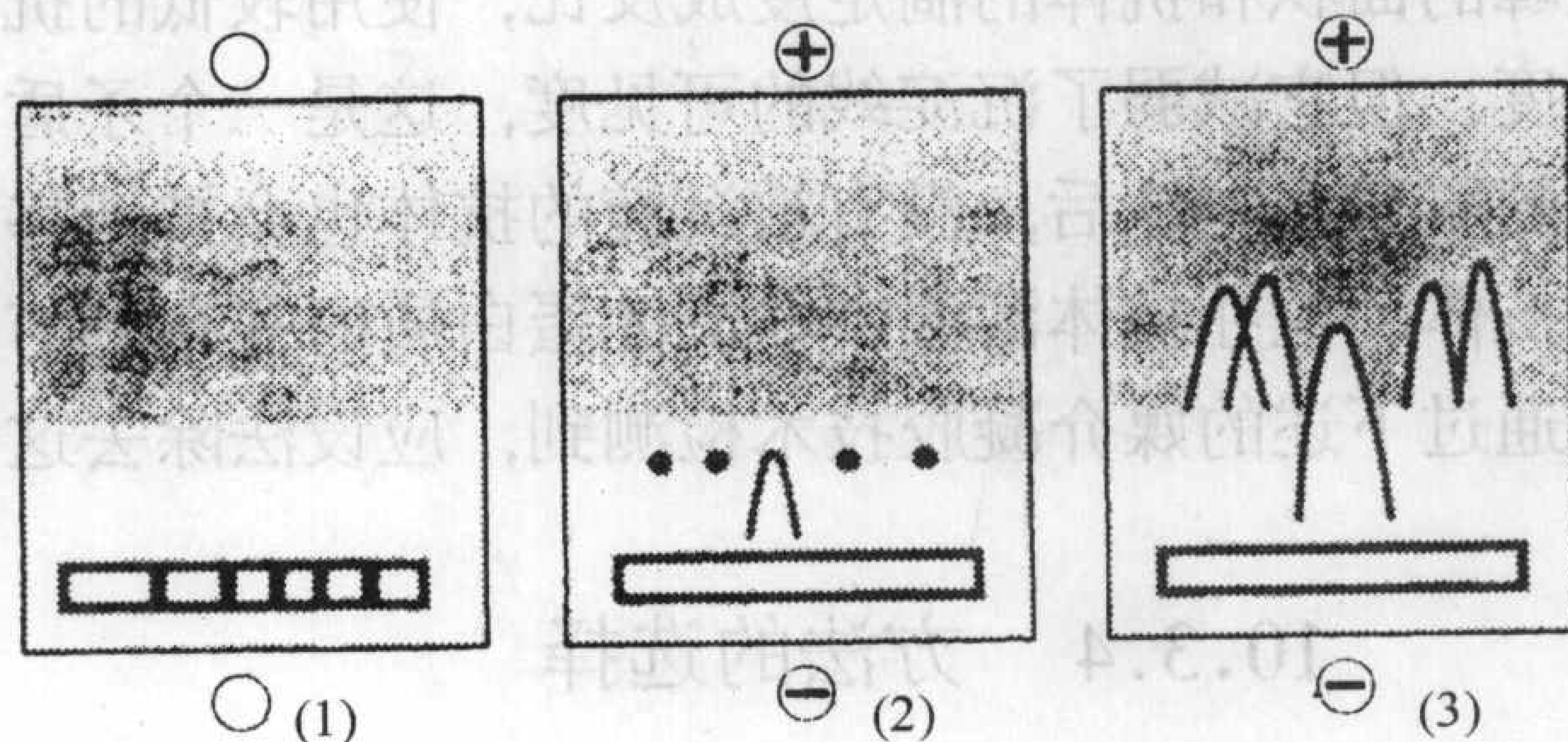


图 10.15 媒介凝胶技术[29]

度的含有用以识别专一性抗原的抗体的凝胶，接着再铺含有多专一性(polyspecific）抗体的凝胶；

2）在第二向电泳，在媒介凝胶中，由于抗原和抗体的专一性结合而形成沉淀峰；

3）其余抗原通过媒介凝胶后在含有多专一性抗体的凝胶中产生沉淀。

另一种媒介凝胶技术如图10.16[30]：

1）在媒介凝胶中含有与抗原相同的纯样品；

2）在电泳时，在媒介凝胶中的抗原向前移动到第三部分铺的凝胶中直到与抗体达到反应的等价点；

3）被识别的抗原在它自己的基线上，但在其他沉淀峰的上面。

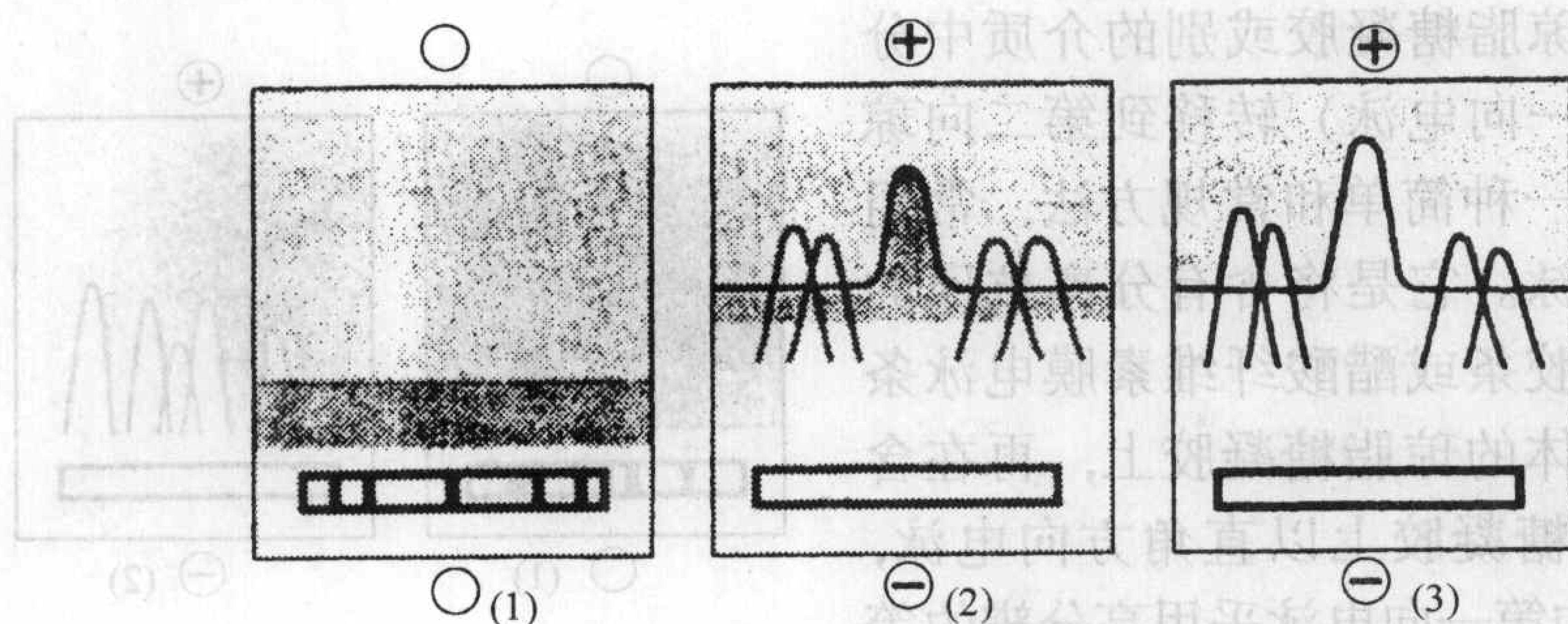


图 10.16 交变媒介凝胶技术[30]

10.3.7 免疫沉淀的观察

最简单的方法是利用侧光观察强的沉淀线。把电泳后的凝胶放在暗表面上，光源水平地放在一侧，就能在灰背景上看到明显的白线。

免疫电泳通常也用考马斯亮蓝染色，将凝胶压缩和干燥可以加快染色。银染[31]和放射自显影[32]当然更灵敏。

当抗原含有专一染色基团，如脂蛋白[33]、糖蛋白[34]时，能看到专一的沉淀

线。专一的酶检测[35]在免疫沉淀后，仍然能保持其酶活性。

免疫电泳的检测极限取决于所使用的技术，抗原-抗体系统的沉淀方式和电泳后检测方法的灵敏度[36,37]，如：

融合“火箭”免疫电泳	5μg/ml
交叉免疫电泳	1μg/ml
放射免疫检测（RLA）	<20ng/ml

文献[38,39]叙述了免疫电泳中通常发生的问题，如在阴极侧没有足够的缓冲能力及其解决办法。

参考文献

[1] Verbruggen R. Clin. Chem., 1975 (21): 5～43

[2] Axelsen N H (Ed.), Quantitative Immunoelectrophoresis: new developments and applications. Universitetsforlaget, Oslo, 1975

[3] Mancini G, Carbonara O A, Heremans J F. Immunochemistry, 1965 (2): 235～254

[4] Ouchterlony Ö. in Handbook of Experimental Immunology, Weir D. M., Blackwell Sci. Publ., Oxford & Edinburgh, 1967. 655～706

[5] Grabar P, Williams C A Jr. Biochim. Biophys. Acta, 1953 (10): 193

[6] Laurell C B, Scand. J Clin. Lab. Invest. 29, Suppl. 1972 (124): 21～37

[7] Bjerrum O J, Ingild A, Lowenstein H, Weeke B. Clin. Chim. Acta, 1973 (46): 337～343

[8] Grubb A O, J. Immunol, 1974 (112): 1420～1425

[9] Svendsen P J. in Axelsen N H, Kroll J. Weeke B, A Manual of Quantitative Immunoelectrophoresis, Universitetsförlager, Oslo, 1973

[10] Portocala R, Lab M, Soteriadou K. Spyrou N in Electrophoresis' 82, Stathakos, D., Walter de Gruyter, Berlin & New York, 1983. 587～597

[11] Clarke M H G, Freeman T. Clin. Sci., 1968 (35): 403

[12] Lampreave F, Gonzalez-Ramon N et al. Electrophoresis, 1994 (15): 666～671

[13] Pipkin J L, Hinson W G et al. Electrophoresis, 1994 (15): 677～684

[14] Kroll J, in Axelsen, N. H., Kroll, J. & Weeke, B., A Manual of Quantitative Immunoelectrophoresis, Universitetsförlager, Oslo, 1973

[15] Estela L A, Heinrichs T F. J. Clin. Pathol., 1978 (70): 239～243

[16] “Multiphor Ⅱ Electrophoresis System users Manaal” Pharmacia LKB Biotechnology, 1992, 136～148

[17] Lizano J, Hellsing K. Clin. Chem., 1974 (20): 1181～1186

[18] Saravis CA, Zamchek N. J. Immun. Methods, 1979 (29): 91～96

[19] Anhalt J P, Kenny G E, Rvtel T I, Cumitech 8 (Cumulative Techniques and Procedures in Cli-nical Microbiology), Amer. Soc. Microbiol. 1978

[20] Bussard A, Huer J, Biochim. Biophys. Acta, 1959 (34): 258～260

[21] Axelsen N H. in Axelsen N H, Kroll J. Weeke B., A Manual of Quantitative Immunoelectrophoresis, Universitetsförlager, Oslo, 1973

[22] Plumley F G, Schmidt G W. Anal. Biochem., 1983 (134): 86～95

[23] Hagen I, Bjerrum O J, Solum N O. Eur. J. Biochem., 1979 (99): 9～22

[24] Kessler R E. Anal. Biochem., 1981 (116): 129～132

[25] Havez R in Automated Immunoprecipitin Reactions. New Methods, Techniques and Evaluations, Technicon Corp., Brussels & New York, 1972. 45～52
[26] Bjerrum O J, Bjerrum B J, Heegaard N H H. Electrophoresis, 1995 (16): 1401～1407
[27] Solum N O, Holme P A, Pedersen T M. Electrophoresis, 1995 (16): 1408～1413
[28] Kostner G, Holasek A. Anal. Biochem., 1972 (46): 680～683
[29] Svensden P J, Axelsen N H. J. Immunol. Methods, 1972 (1): 169
[30] Kroll J, Scand J. Clin. Lab. Invest, 1969 (24): 55
[31] Willoughby E W, Lambert A. Anal. Biochem., 1983 (130): 353～358
[32] Milhaud G, Szlamka I. Experientia, 1971 (27): 1335～1336
[33] Karlsson B W, Johansson M B N. J. Immunol. Methods, 1972 (1): 375～380
[34] Bog-Hansen T G, Brogren H, Rostgaard M. J. Int. Res. Commun. Sys., 1973 (1): 9
[35] Owen P, Kaback H R. Biochemistry, 1979 (18): 1413～1422
[36] Bjerrum O J, Biochim Biophys. Acta., 1977 (472): 135～195
[37] Ramlau J, Bjerrum O J. Scand J. Immunol., 1977 (6): 867～871
[38] Bjerrum O J. Electrophoresis, 1985 (6): 209～226
[39] Guinet R M F. Electrophoresis, 1983 (4): 224～227

第 11 章　蛋白质印迹

11.1　原　理

蛋白质印迹（protein blotting）也称为电泳转移（electropheretic transfer），即把从电泳或层析分离的蛋白转移到固定基质上的过程。固定基质通常是一些纸或膜[1~6]。最通常的蛋白质印迹是将从聚丙烯酰胺凝胶电泳上分离的蛋白质分子转移到硝化纤维素膜上。如前几章所述的聚丙烯酰胺凝胶电泳有很好的分辨率和广泛的应用，但进一步分析受到限制，因为电泳后大部分蛋白质分子被嵌在凝胶介质中，探针分子很难通过凝胶孔到达它的目标，且探测过程中的扩散现象会破坏邻近带的特征。虽然可以用洗脱[7]或直接在原位用抗血清[8,9]或蛋白探针[10]分析，但这些方法耗时，不灵敏，并导致分辨率的损失。蛋白质印迹方法克服了这些问题：

1）一旦转移到固定基质上，蛋白质分子比在凝胶中容易接近探针。而且所有被转移的蛋白都有相同的机会与探针接触（个别例外）；
2）转移到固定基质上的蛋白带在探测过程中不会因扩散而失去分辨率；
3）蛋白质转移到膜上后能进行多种分析，因而能得到多份结果；
4）印迹方法只需很少的试剂，处理时间相对较短，且固定化膜容易操作和保存。所以蛋白质印迹方法是高分辨电泳和灵敏、专一的免疫探测技术的结合，现在这种杂交技术已得到广泛的应用。

把电泳分离的蛋白组分转移到固定膜上，即蛋白质印迹法（即人们常称的“western blotting”）首先是在 1979 年由 4 个研究小组报道[11~14]的，但现在普遍使用的是 Towbin 等[14]的方法。这个方法实际上是 1975 年 Southern[15] 的 DNA 印迹法（即人们常称的“southern blotting”）的发展。

一个典型的印迹实验包括 4 个步骤[1~6,16]：

1）蛋白质在固化基质上固定化，这能通过直接加样得到，如下节所述的“dot blotting”是或主动或被动地从凝胶转移到膜上；
2）用非特异性，非反应活性分子封阻固定基质上未吸附蛋白质的区域，这一步被称为“封阻”（blocking）或“淬灭”（quenching）；
3）用探针检出固定基质上感兴趣的蛋白质。这是一个多步过程，但至少有一步是携带用于随后检测的“报告”基团；
4）用标记在探针上的报告基团检测感兴趣的分子，见图 11.1[17]。

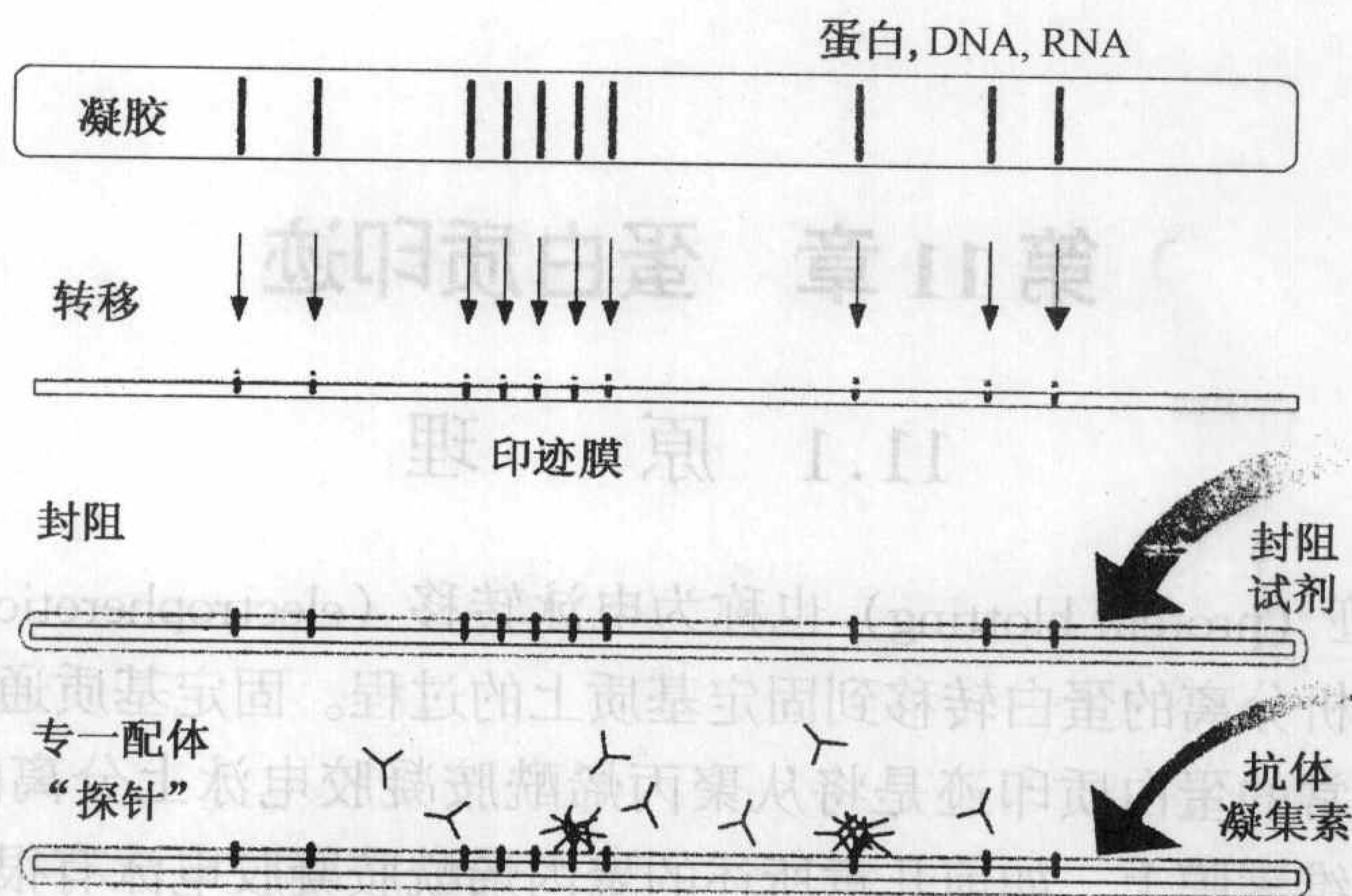


图 11.1　蛋白质印迹通常所需的 4 个步骤[17]

11.1.1　几种印迹方法

蛋白质印迹有 4 种基本方法：点印迹、扩散印迹、溶剂流印迹（毛细管印迹）和电泳印迹。

11.1.1.1　点印迹

在进行点印迹（dot blotting）时，通常用微量移液管和注射器把小体积的样品溶液（$<2\mu l$）直接加在固相膜上[18]。它能用于测定蛋白质浓度，在膜上加一系列稀释溶液就可测定检测极限。当用不同探针做多种检测和大体积样品时可用市售的微量过滤多支管（microfiltration manifolds）。

点印迹常常能提供需要的信息，特别是对凝胶电泳的分辨率要求不高和摸索新的印迹条件时特别合适。由于蛋白质与探针的定量结合，可用于定量测定。放射性标记的探针能直接用计数方法或间接用光密度计或放射自显影测定。酶标记的探针也可用光密度计扫描测定。

11.1.1.2　扩散印迹

扩散印迹（diffusion blotting）为凝胶中的样品转移提供了一个最简便的方法。由于分子扩散是多方向的。所以凝胶放在两张固相膜之间，浸在缓冲液中让其扩散 2～3 天，结果便得到两张成镜像对称的转移谱，见图11.2 [17]。扩散印迹的效率约为 50%～70%[19～21]，每张膜得到一半的蛋白质。由于扩散与温度有关，这个技术也可称为“温度印迹”（thermoblotting）。扩散印迹方法适合于大

孔凝胶。这种方法虽然简便，但耗时且损失分辨率。

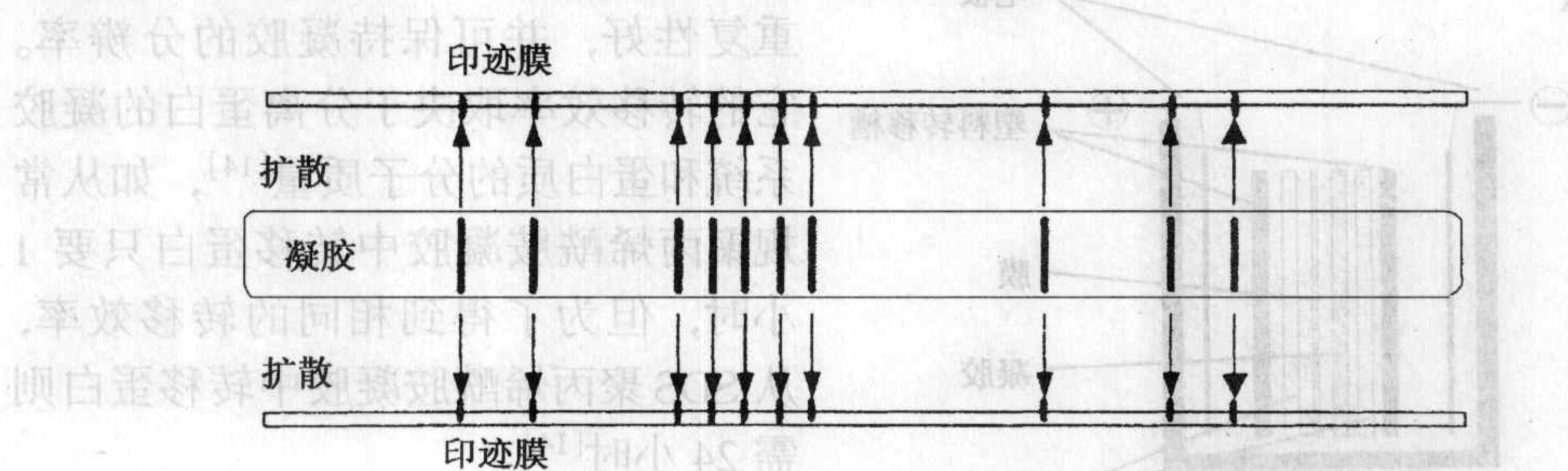


图 11.2　大孔径凝胶的双向扩散印迹[17]

11.1.1.3　溶剂流印迹

溶剂流印迹（solvent flow blotting）即在 1975 年首先由 Southern[15] 用于 DNA 转移的“毛细管印迹”（capillary blotting），同年 Alwine 等人[22]将此法用于 RNA 转移，被称为“Northern blotting”。经过改进后又被用于蛋白质[12]，称“Western blotting”。毛细管印迹也很简单，适合于低分子质量蛋白质和大孔凝胶[23]。缓冲液借助毛细管流从贮液腔中通过凝胶和固相膜，在膜上加一叠干滤纸，再在上面加 1～2kg 重量，见图11.3[17]。溶剂流将凝胶中的蛋白带出凝胶流到膜上，过夜后能回收大部分蛋白质，如果用真空减压的方法也可在 1 小时完成[24]。

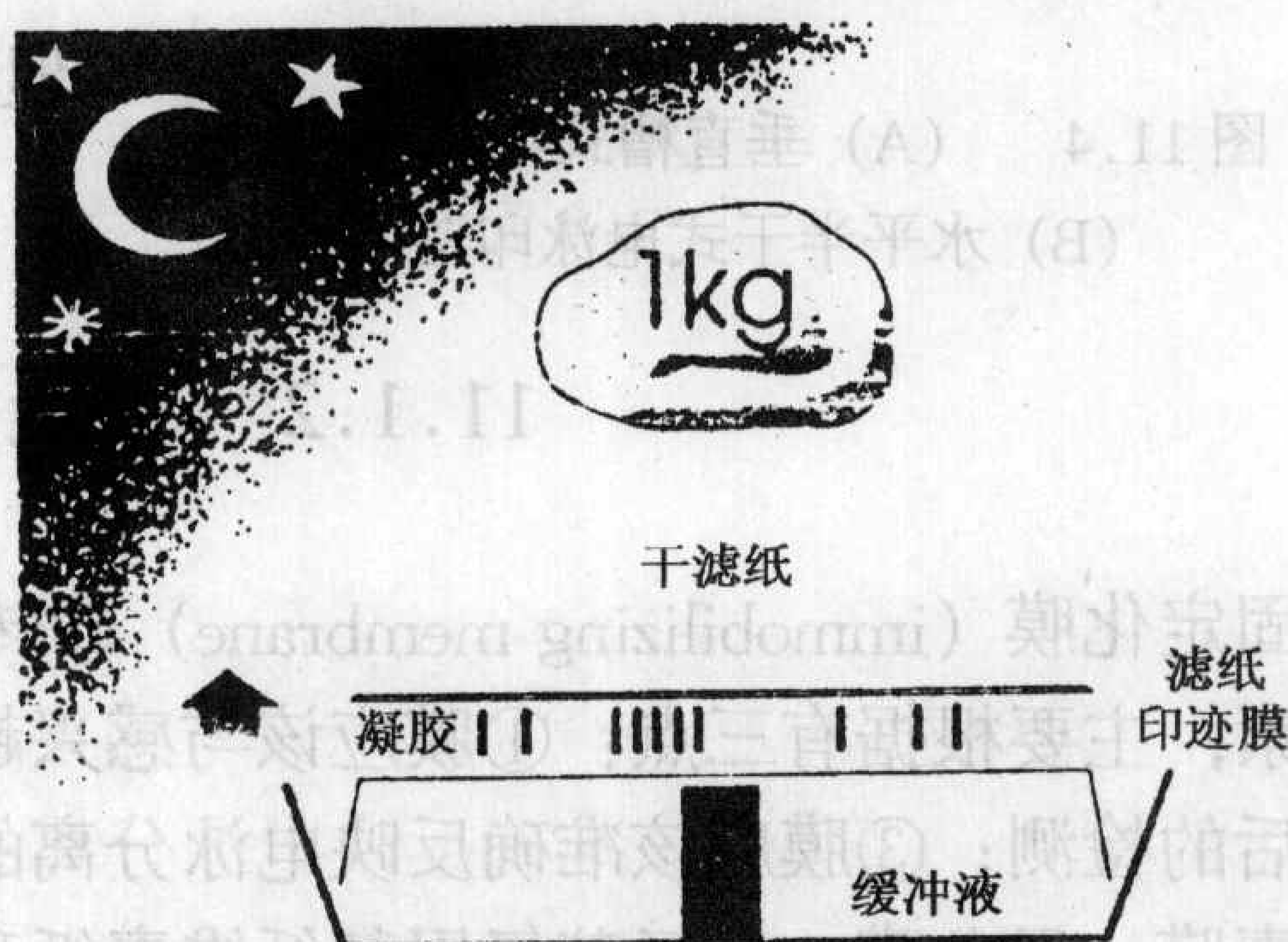


图 11.3　毛细管印迹

毛细管转移也可用于玻璃和塑料上的等电聚焦凝胶[25～27]和薄层层析[28]。这时应称为“重压印迹”（press blotting）。在凝胶上放一张用缓冲液浸湿的膜，两张湿的滤纸和一叠干滤纸，再在上面压一个重量，如果凝胶厚度小于0.4 mm，印迹约需 15～30 分钟。

11.1.1.4　电泳印迹

现在最广泛使用的印迹方法是 1979 年由 Towbin 等[14]提出的。他们用电场将凝胶中的蛋白转移到膜上[1～6, 14, 16, 29～31]。电泳印迹（electrophoretic blotting）

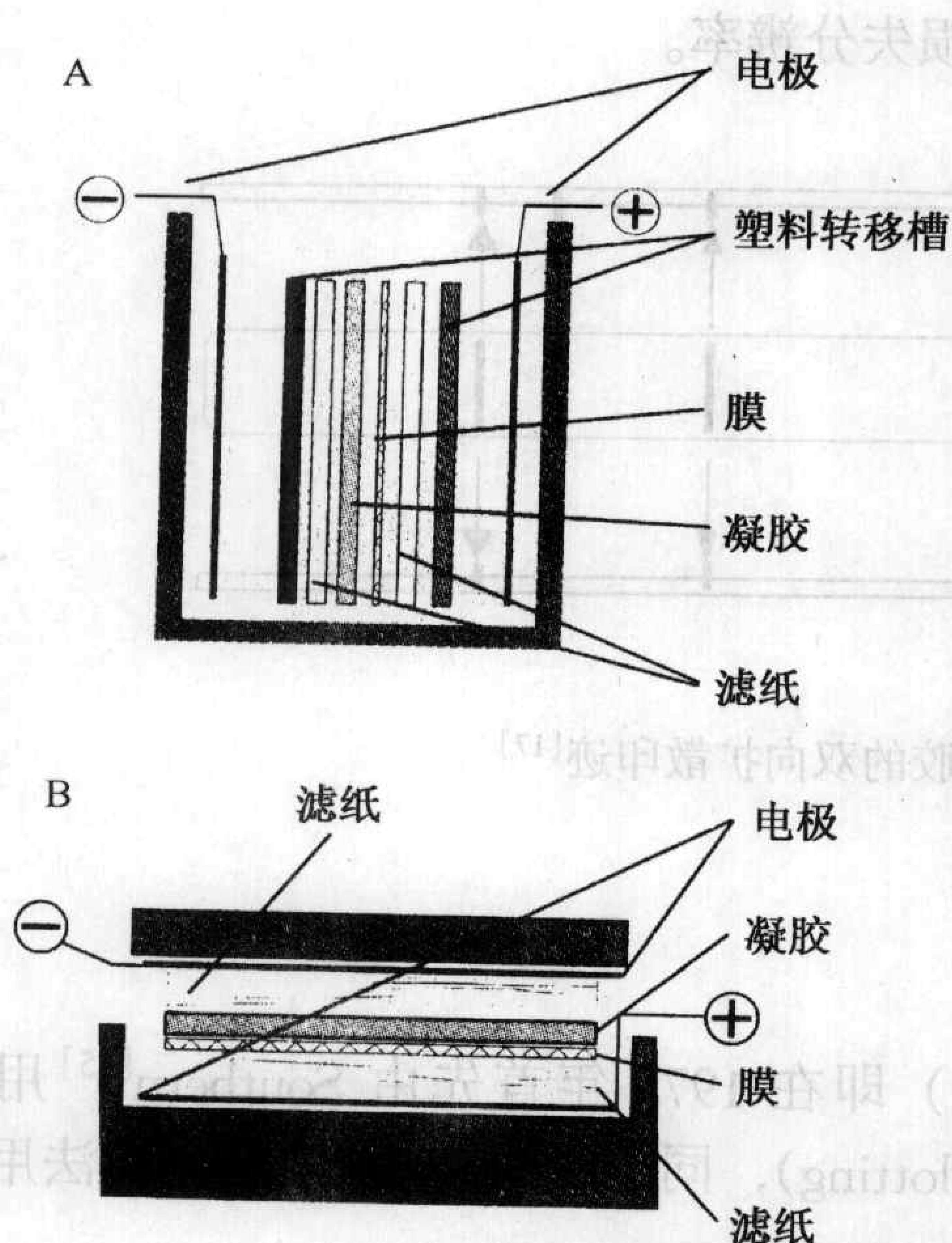


图 11.4 (A) 垂直槽式电泳印迹；(B) 水平半干式电泳印迹

快，转移效率高，转移条件容易控制，重复性好，并可保持凝胶的分辨率。它的转移效率取决于分离蛋白的凝胶系统和蛋白质的分子质量[14]，如从常规聚丙烯酰胺凝胶中转移蛋白只要 1 小时，但为了得到相同的转移效率，从 SDS 聚丙烯酰胺凝胶中转移蛋白则需 24 小时[14]。

与上述三种印迹方法不同，电泳印迹需要一定的装置。现在有垂直的槽式和水平的半干式。装置十分简单，见图11.4，但它们都需要配备较大电流（1～5A）的电源。电泳印迹，又称电泳转移（electrophoretic transfer)，尽管在称谓上有一些异议[1,2,5,24,32]，但它们的作用已为人们所熟知。

11.1.2 固定化材料

固定化膜（immobilizing membrane）即转移介质的选择是影响转移效率的重要因素，主要根据有三点：①膜应该与感兴趣的蛋白质分子相结合；②膜不应影响随后的检测；③膜应该准确反映电泳分离的结果。现在常用的固定化膜有硝化纤维素膜、尼龙膜、重氮苄氧甲基纤维素纸和重氮苄氧醚纤维素纸等。

11.1.2.1 硝化纤维素膜

硝化纤维素膜（nitrocellulose membrane）是首先被用于蛋白质印迹的转移介质[14]，并且至今仍被广泛使用。它的优点是高灵敏，高分辨、高结合能力（80～100 μg/cm^2），且膜不需要活化，使用简便，经济；背景染色浅；并可用常规染色，放射性或非放射性方法检测；功能基团寿命较长；膜至少可在 4℃ 保存一年。干的硝化纤维素膜很脆，要小心操作。

硝化纤维素膜与蛋白质的结合特性现在还不很清楚，可能与几种因素有关，如疏水相互作用、离子相互作用等。硝化纤维素膜的特性由它的孔径和组成决定。它的结合能力与孔径成反比。初步实验应使用0.45 μm 的膜。小孔膜(0.1 ～0.2 μm)适合于分子质量小于 20 000Da 的蛋白[33]。

用聚酯作支撑的膜会产生杂色斑带并损失分辨率，但由于有膜的支撑可用于

多次检测操作而不会损坏硝化纤维素膜。

含有醋化纤维素的硝化纤维素膜应避免使用，因为它的结合能力低，并且不稳定。

11.1.2.2 尼龙膜

尼龙膜（nylon-dased membranes）也能用于蛋白和核酸的转换。尼龙膜软且结实，比硝化纤维素膜容易操作。它与蛋白质或蛋白质-去污剂混合物有很高的结合能力。每平方厘米可结合 480μg 蛋白，但硝化纤维素膜只能结合 80～100μg 蛋白[34]，所以灵敏度较高，但背景也高，因为它的高电荷密度使非结合区的封阻比硝化纤维素膜困难，因而与阴离子染料，如氨基黑和考马斯亮蓝也有较强的结合能力，所以不能用阴离子染料在带正电的尼龙膜上作专一性的蛋白质染色，而应使用其他染色方法[35~37]。

带正电的尼龙膜能有效地结合低浓度的小分子蛋白质[38~40]、酸性蛋白、糖蛋白[41]和蛋白多糖[42]。但当转移缓冲液中存在 SDS 时能观察到蛋白质从尼龙膜上泄漏[38,43]，如用甲醛固定能提高蛋白质在尼龙膜上的保留指数[38]。

11.1.2.3 DBM 和 DPT 纸

在早期实验中，一些专用的纸被使用，包括离子交换纸和活化纸。前者如 DEAE 纤维素（diethylaminoethyl cellulose）[44~46]和磷酸纤维素纸[47]。后者如重氮苄氧甲基（diazobenzyloxymethyl，DBM）和重氮苯硫醚（diazophenylthioether，DPT）纤维素纸[48,49]。离子交换纸在湿的时候非常容易破损，用共价结合纸虽然能保持住蛋白质并重新探测，但结合能力较低（25～30μg/cm^2），分辨率也很低[30,50,51]。DBM 和 DPT 必须使用放射性标记探针，因为在活化时有颜色。纤维素滤纸能用溴化氰[52,53]、氰尿酰氯（cyanuric chloride）[54]、苯醌[55]活化以共价结合被转移的蛋白质。活化后必须立即使用，因为反应基团是不稳定的。活化的玻璃纤维滤纸能用于回收转移的多肽，以进行 N 端氨基酸序列分析[56~58]。

转移到 DBM 和 DPT 纸上的蛋白质或核酸分子共价结合到纸上，因此操作时损失最小，并且能作多次探测。一些缓冲液成份如甘氨酸必须在转移前用磷酸缓冲液从凝胶中洗去，否则会干扰蛋白质与 DBM 纸的结合。DBM 仅在一定的 pH 范围稳定，所以在等电聚焦凝胶上转移蛋白时不要超过它的稳定范围。

11.1.2.4 PVDF 膜

聚亚乙烯双氧化物（polyvinylidene difluoride，PVDF）[56,59,60]和聚砜（类）膜（polysulfone membranes）也能被用作固定化材料。与硝化纤维素膜相比，PVDF 膜有很高的机械强度，操作方便。并可用于多次检测。结合能力 125～200μg/cm^2。而且 PVDF 膜化学稳定性好，可用于各种溶剂配制的样品，特别适

合于糖蛋白的转移、检测和蛋白质测序。

PVDF 膜使用前先用 100% 甲醇润湿，再泡在蒸馏水中方可使用。

11.1.3 转移缓冲液

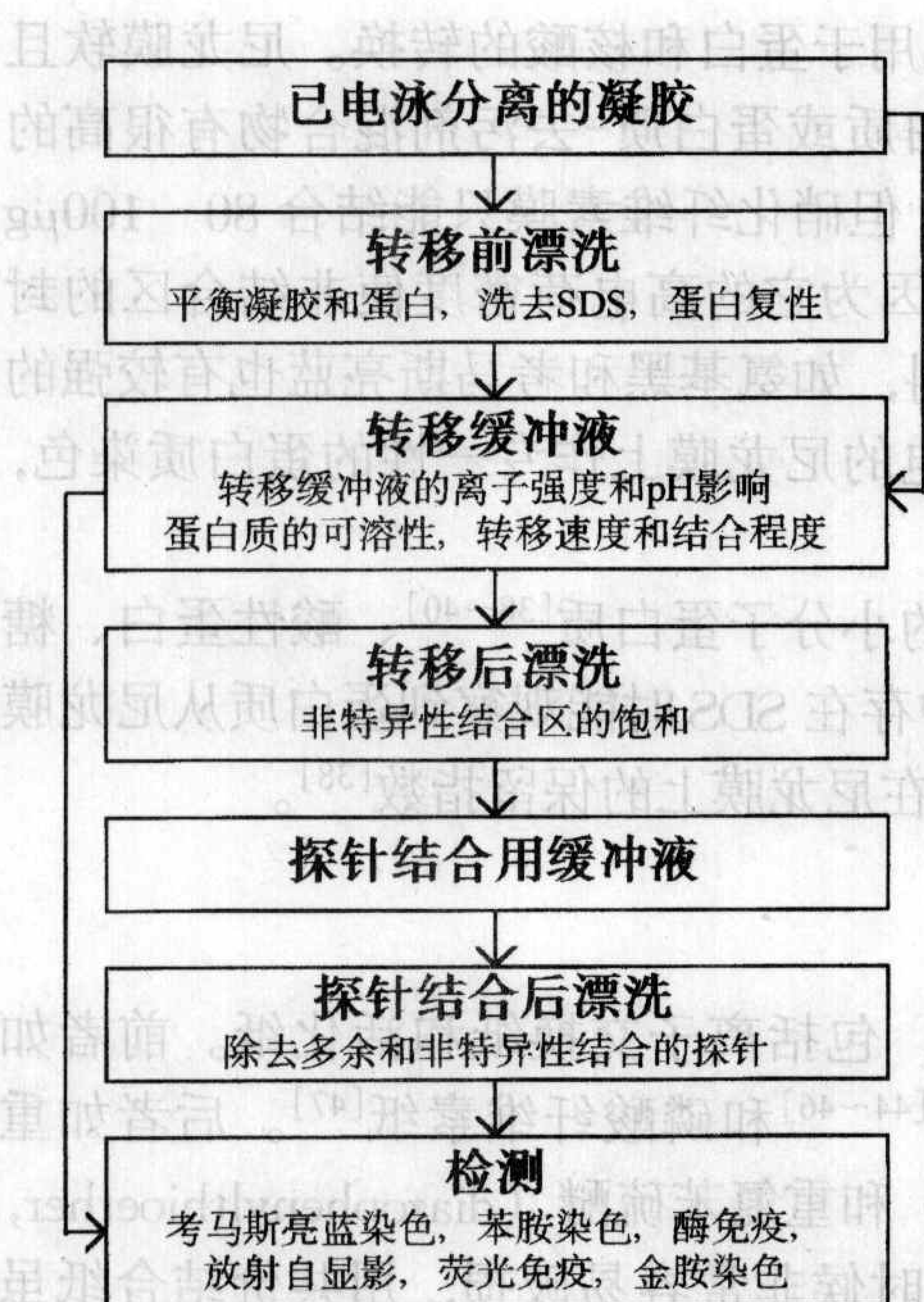


图 11.5　转移前、后的漂洗

在设计蛋白质印迹实验时，转移缓冲液的选择和转移前、后的漂洗是非常重要的。图11.5 为通常使用的过程。转移前漂洗所用的缓冲液与转移用的缓冲液相同，以避免凝胶的肿胀或收缩。缓冲液中加0.5% Triton 和 4mol/L 尿素以除去 SDS 并使蛋白质复性[62,63]。

为了得到最有效的转移，不但必须有足够的时间，缓冲液的 pH 和离子强度还必须使蛋白质有最大的可溶性和转移速度。在电泳印迹实验中通常使用 Tris-甘氨酸缓冲液[63,64]。如采用重氮化合物，如 DBM 和 DPT 纸，应使用磷酸缓冲液，以防止甘氨酸在膜的结合区与蛋白质竞争[65]。

11.1.4 封阻、标记和检测

转移后，为了减少探针的非专一性结合，要封阻（block）膜上的自由结合区，以防止检测时的高背景。封阻通常是将膜放在如下溶液系统中，如 Denhardt 试剂[66]；2%～5%牛血清白蛋白溶液[63,64]；0.05%～0.3%的去污剂[1~6,16]。

有很多种不同的蛋白质和配体可用于标记印迹蛋白。探针结合用的缓冲液应适合蛋白质与探针的专一性结合，而使非专一性结合减到最小。用增加盐浓度的方法洗脱结合的探针可以达到这个目的。

在蛋白质印迹实验中的重要一步是检测转移到膜上的蛋白质。有时在转移前应先对凝胶进行染色观察，以便了解转移的效率，印迹的最终灵敏度取决于标记探针的特告基团的特性。常用的检测系统有放射性同位素、酶[1~6]、荧光和化学发光[67~70]、胶体金属颗粒[71]和染料[1~6]用于总蛋白染色。

11.2　方　　法[72]

与垂直槽式电泳转移相比，水平半干转移节省缓冲液，操作方便，可以快而均匀有效地将蛋白质从凝胶转移到固定化膜上。前者适合于较长时间的转移。

11.2.1　从SDS凝胶上转移蛋白质

11.2.1.1　溶液配置

(1) 连续缓冲系统

甘氨酸 39mmol/L；Tris 48mmol/L；SDS 0.0375%（*W/V*）；甲醇 20%（*V/V*）。溶液均需用双蒸水配置。这个缓冲系统可用作阳极缓冲液，也可用作阴极缓冲液。

(2) 不连续缓冲系统

阳极缓冲液Ⅰ：0.3 mol/L Tris，pH 10.4，20%甲醇。

阳极缓冲液Ⅱ：25mmol/L Tris，pH 10.4，20%甲醇。

阴极缓冲液：4mmol/L 6-氨基-n-己酸，pH 7.6，20%甲醇。

缓冲液中的甲醇可以防止SDS凝胶的肿胀，但由于它的固定作用可能使蛋白质变性，结果导致转移效率降低。反之，甲醇由于增强疏水反应可能增加蛋白与硝化纤维素膜的结合能力。

11.2.1.2　转移单元的组成

先将凝胶从支持膜上剥离下来，如图11.6组成转移单元。如使用连续缓冲系统，阳、阴极侧滤纸使用相同缓冲液。如使用不连续缓冲系统，第一层的6张滤纸用阳极液Ⅰ浸湿并放在阳极板上。如有多个转移单元时，第一层的3张滤纸用阳极液Ⅱ浸湿，每个单元的最后3张滤纸和邻近阴极板的6张滤纸用阴极液浸湿。操作时应带手套。每层之间要避免气泡。为了确保电流仅仅通过凝胶，要使所有转移单元的组成都与被转移的凝胶有同样的大小。相同形式和大小的几块凝胶能同时把一个单元堆在另一个单元上进行转移。可同时转移的单元数取决于仪器的性能。在单元之间要放一张玻璃纸透析膜，以防止转移单元之间的交叉污染。

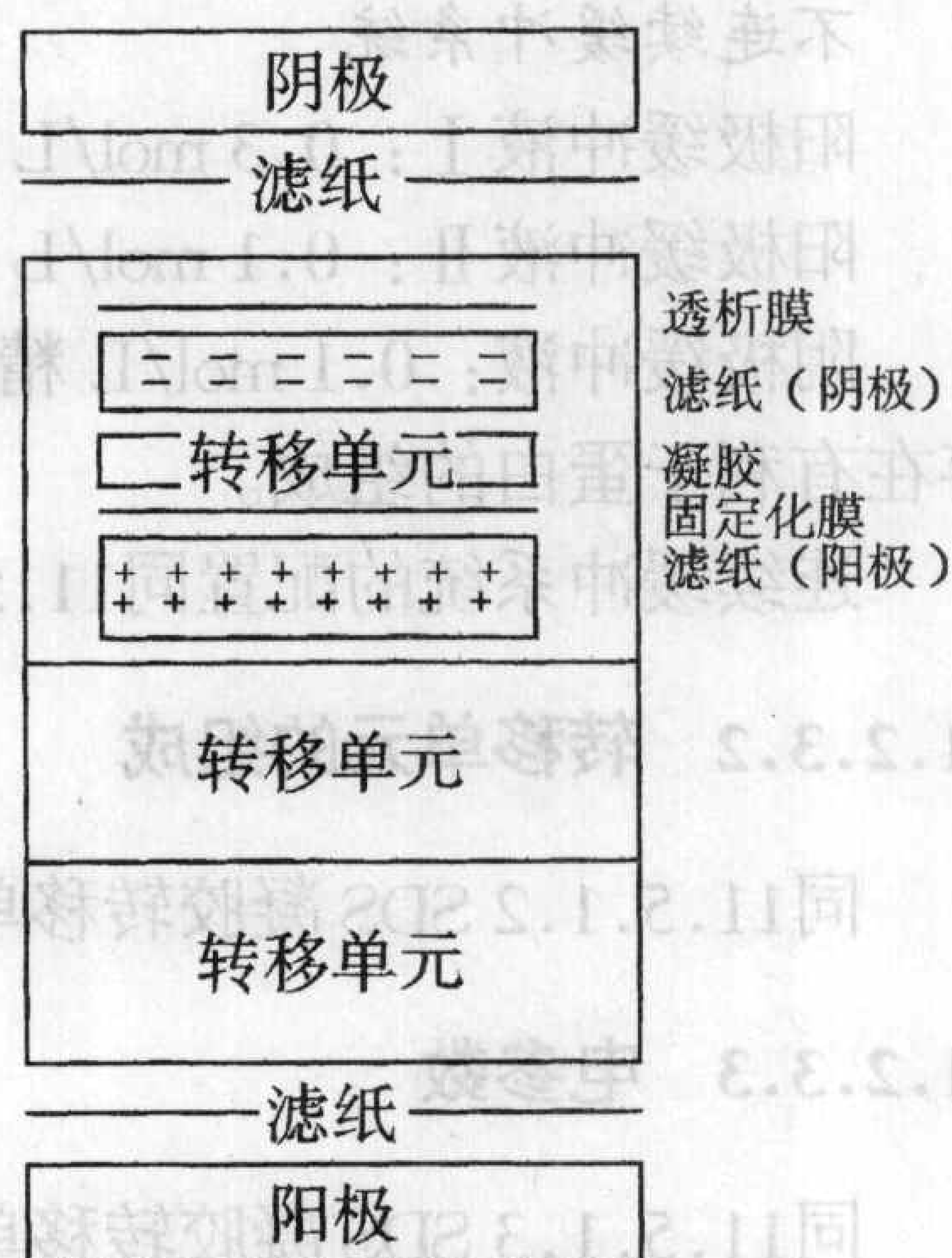


图 11.6　转移单元的组成

11.2.1.3　电参数

转移时的电流为0.8 mA/cm^2。SDS凝胶转移所需的时间约为0.5 ～1 小时。取决于固定化材料和缓冲液的选择，仪器的性能等。

11.2.2　从琼脂糖凝胶上转移蛋白质

11.2.2.1　溶液配置

不连续缓冲系统

阳极缓冲液Ⅰ：0.3 mol/L Tris，pH 10.4 。

阳极缓冲液Ⅱ：25mmol/L Tris，pH 10.4 。

阴极缓冲液：40mmol/L 6-氨基-n-己酸，pH 7.6 。

11.2.2.2　转移单元的组成

同11.5.1.2，SDS凝胶转移单元的组成。

11.2.2.3　电参数

转移的电流也为0.8 mA/cm^2。但由于琼脂糖凝胶孔径大，转移所需的时间约为聚丙烯酰胺凝胶的一半。

11.2.3　从等电聚焦凝胶上转移蛋白质

11.2.3.1　溶液配置

不连续缓冲系统

阳极缓冲液Ⅰ：0.3 mol/L Tris，pH 10.4 。

阳极缓冲液Ⅱ：0.1 mol/L Tris，pH 10.4 。

阴极缓冲液：0.1 mol/L 精氨酸，0.01 %（*W*/*V*）SDS，pH 10.5 。SDS的存在有利于蛋白的组成。

连续缓冲系统的配置同11.5.1.1 SDS凝胶的转移。

11.2.3.2　转移单元的组成

同11.5.1.2 SDS凝胶转移单元的组成。

11.2.3.3　电参数

同11.5.1.3 SDS凝胶转移单元。

11.2.4 检　测

电泳转移后，小心地从固定化材料上剥离凝胶。如果有小块凝胶留在膜上，用双蒸水洗，然后用湿的软棉花擦去凝胶，残留在膜上的凝胶会导致染色后在膜上出现“白点”。膜可以贮存，也可以立即染色或用其他方式检测。大部分用于电泳的染色方法都可用于膜。主要的限制是背景染色。印度黑染色很灵敏，可达100ng，而且只有很弱的背景[73]。氨基黑染色背景也很弱，染色时间只要1小时，灵敏度为1.5 μg，可同时用于凝胶和膜[14]。

如将干膜染色，首先应该将膜放在水中，否则高浓度的甲醇会将膜弄扭曲，甚至溶解。如果转移后在Denhardt试剂或牛血清白蛋白中温育，能得到较好的结果，但背景也较高。使用放射性标记蛋白时，应该先干燥膜再做放射自显影。

Heukeshoven等[74]对超薄聚丙烯酰胺凝胶的印迹材料，印迹方法和各种显色方法，如印度黑染色、银染、金染等作了全面的综述。

11.3 实验考虑

11.3.1 电泳转移的效率

电泳转移是在电场下将蛋白质从凝胶中转移到膜上，与其他方式相比，这种方式有较高的转移效率，只需短的时间，并且转移条件比较精确，重复性好。转移效率取决于分离蛋白的凝胶系统和蛋白质的分子质量。如从聚丙烯酰胺凝胶中转移蛋白质只要1小时，但为了得到相同的转移效率，从SDS聚丙烯酰胺凝胶中转移，则需要24小时[63]。转移分子质量大于100kD的蛋白质所需时间也较长。为此，可在转移前用简单而巧妙的原位消化技术（in site digestion technique）[75]将蛋白断裂成几个小的多肽。在组装转移单元前，先用链霉蛋白酶（pronase）溶液浸泡固定化膜。链霉蛋白酶是一种经济、稳定的宽谱酶。一旦电泳转移开始，链霉蛋白酶从膜中进入凝胶，在凝胶中将蛋白质消化。另一种方法是原位的多肽图技术（in site peptide mapping technique）[76]。虽然这种方法比较消耗时间，并且有限于几种蛋白质，但它可以详细测定蛋白质与探针专一结合区的分布[62]。这两个方法虽然都能大大提高转移效率，但同时它们都破坏蛋白质内的电位结合区。

11.3.2 转移缓冲液

转移缓冲液的选择在任何方式的蛋白质印迹实验中都是非常重要的。对凝

胶、介质和膜的特性都需要考虑。缓冲液的组成对蛋白质与膜和探针的结合起着决定的作用。例如去污剂会干扰蛋白质与硝化纤维素膜的结合[77~79]，Tris 和甘氨酸能和膜上的大部分活性基团反应。如果采用点印迹、扩散印迹或溶剂流印迹，对缓冲液的限制主要考虑与膜的相互作用。如用电泳印迹，离子强度也必须考虑，因为缓冲液的导电性决定了转移的条件。转移缓冲液还会影响蛋白质的复性或蛋白质构象的保持以及随后的检测[4,80]。

从 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳到硝化纤维素膜的转移通常采用 Towbin 等的方法[14]：25mmol/LTris，192mmol/L 甘氨酸，pH 8.3，20% 甲醇。甲醇可从 SDS-蛋白质复合物中除去 SDS，还能增加蛋白质和硝化纤维素膜的亲和力。甲醇可能在凝胶的小孔中引起还原反应，限制了一些蛋白质的转移[4,34]。它也可能引起一些蛋白质沉淀或变性，导致转移效率不高或损失生物活性。除去 SDS 后，碱性蛋白质可能变成阳离子或中性型，难以洗脱，如溶菌酶（14 400，pI 10~11）在上述缓冲液中转移不如一些比较大的蛋白质，如白蛋白（66 200，pI 4.9）。在这种情况下，为了改善转移，需要加一些 SDS（高至0.1%）到转移缓冲液中[29,81]。使用 Towbin 缓冲液应避免在缓冲液中长时间平衡凝胶，短时间的漂洗凝胶会得到比较好的结果，在 Tris-甘氨酸中不加甲醇，SDS-蛋白复合物能十分有效地转移到带正电的尼龙膜上[34]。

不同的印迹应该使用不同的转移缓冲液，尿素胶通常在0.7 %醋酸中转移[14]。转移到 DBM 和 DPT 纸上应使用磷酸钠或硼酸钠缓冲液[30,50]。不含甲醇的稀 Tris-甘氨酸缓冲液（15.6 mmol/LTris，120mmol/L 甘氨酸，pH 8.3）和 Tris-硼酸缓冲液（41mmol/L Tris，40mmol/L 硼酸，pH 8.3）适合于转移到带正电的尼龙膜上[4,34]。碱性缓冲液（25mmol/L 乙醇胺-甘氨酸，pH 9.5 ~ 10）[81]和碳酸盐缓冲液，pH 9.8[80,82]可用于碱性蛋白质。

选择转移缓冲液很重要的一点是考虑感兴趣蛋白的等电点。如果缓冲液的 pH 不合适会导致蛋白质迁移变慢，甚至不能转移到膜上。

在转移缓冲液或凝胶中使用去污剂会影响在 NC 膜上结合和保持的蛋白质质量。可以明显地观察到 SDS[79,83,84]，NP-40[77]和 Triton X-100[78]使结合到硝化纤维素膜上的蛋白质还原。CHAPS 也会干扰蛋白质与硝化纤维素膜的结合[78,85]，两性离子去污剂似乎没有什么干扰[86]。

虽然低离子强度的缓冲液由于产生较高的电场强度可能提高转移效率，但报道指出，高离子强度的缓冲液能提高大分子质量蛋白的转移效率[41,87~89]，原因可能是增强了疏水相互作用。

11.3.3 封　阻

转移后为防止探针与蛋白质的非专一性结合而使用的封阻试剂[90]包括白明

胶[91,92]、牛血清白蛋白[93,94]、卵白蛋白[1]、血红蛋白[34]、动物血清[14]、酪蛋白[1]、脱脂干奶（blotto）[95,96]和无离子去污剂吐温-20[39,93,94,97]。各种封阻试剂具有自己的特点，如血红蛋白对膜产生“负染”[34]；鱼白明胶易溶解，能在4℃使用，但会屏蔽印迹蛋白[91]；脱脂干奶经济且易使用，但它含有竞争性的反应物（如生物素），因而引起信号强度的减弱[96]；血清含有潜在的交叉反应免疫球蛋白[90]；牛血清白蛋白含有碳氢化合物污染物，用外源凝集素作探针时会增加背景[98,99]。

过高浓度的封阻试剂是有害的。一些封阻试剂在硝化纤维素膜上代替了蛋白质位置[6,92,93]。蛋白质封阻试剂的浓度不应超过3%，吐温-20的浓度不能超过0.3%。离子去污剂NP-40，Triton X-100应避免使用[79,83,84,87,98,100]，因为它们比吐温-20更能从硝化纤维素膜上替代蛋白质[77~79,92,98,101]。而且SDS[98,100]、NP-40[87,93,101]、Triton X-100[79,98,101]在漂洗和探测过程中会使一些蛋白质从硝化纤维素膜上释放。CHAPS[85]和吐温-20[101]也使一些蛋白质从硝化纤维素膜上失去，但要比上面提到的去污剂少一些。

适合于各种检测方式的理想封阻试剂至今未见报道。对硝化纤维素膜上印迹蛋白的免疫检测，0.05%吐温-20是简单有效的封阻试剂[39,97,90]。Baldo等[102]建议印迹后，先将膜在3%明胶溶液中温育，然后在0.05%吐温-20中洗两次，每次5分钟。用于封阻和印迹的免疫检测的最好缓冲液是0.02 mol/L Tris-HCl，0.5 mol/L NaCl，pH 7.5。

带正电荷的尼龙膜比硝化纤维素膜需要更加有效的封阻，因为这些膜有很高的蛋白质结合能力。用10%的明胶或牛血清白蛋白在50℃过夜来封阻尼龙膜会得到比较低的背景[34]。干的封阻印迹膜能在室温保存几个月，在冰箱或冷冻状态下保存时间更长。

11.3.4 探　　针

很多种不同的蛋白质和配体可用于探测印迹蛋白，如外源凝集素能探测糖蛋白上糖量的信息[4,60,99,103~106]；配体能用于探测它们相应的受体[4,85,107,108]；核酸能用于检测它们各自的结合蛋白[4,109~112]。抗体是最常用的专一探针[1~6]。当用抗体作探针时称为免疫印迹。封阻后，膜用专一的第一抗体温育（从粗制抗血清或培养上清液到纯化的抗体）。漂洗后，用第二抗体温育，第二抗体通常是高度纯化的，并用放射性同位素标记报告基团的酶或金属胶体。在没有反应的第二抗体被洗去后，便可检测到感兴趣的抗原。

高纯度的、高亲抗原性抗体是最好的原始和第二免疫探针，使用高浓度的抗体会加重由于交叉反应和非专一性相互作用引起的噪音信号。免疫试剂的合适浓度都必须经验性地测定。点印迹可方便地用于测定抗体的工作浓度。抗血清常用

1∶100～1∶5000 倍稀释；培养液上清用 1∶2～1∶100；腹水用 1∶200～1∶10 000[113]。第二抗体-酶结合物通常用 1∶3000[102]。为了减少探针在膜上的非专一性吸附。在稀释缓冲液中应包括吐温-20 和压载（ballast）异种蛋白。封阻溶液常常是很好的探针稀释液。通常可用 1% 明胶，0.05% 吐温-20（在 0.02 mol/L Tris-HCl，0.5 mol/L NaCl，pH 7.5）中作为稀释缓冲液。

单特异性抗体可用于不清晰的印迹分析，抗体的质量应该用对照实验来测定。多克隆抗体和单克隆抗体应纯化，最好用亲和柱吸附的方法从原始血清中除去潜在的交叉反应抗体[102]。

葡萄球菌蛋白 A（staphylococcal protein A）[114]和葡萄球菌蛋白 G（staphylococcal protein G）[115]是常用的第二抗体。这些细菌蛋白质特异性地结合到许多不同哺乳动物的免疫球蛋白上。蛋白 A 是两者之中用得比较好的一种，它结合到 IgG 分子的 Fc 部分[116]。在免疫检测条件下，一个标记蛋白 A 的分子仅仅结合到一个 IgG 分子上[113]。蛋白 G 的功能与蛋白 A 类似，但它能在较大的范围辨别免疫球蛋白。

三重抗体探针方法（triple antibody probing method）即预先形成酶和抗体的复合物，就像第二抗体与第一抗体的交联一样也可用于探测[117]。许多工作者利用生物素与抗生物素之间的牢固结合来标记印迹蛋白[106, 118, 119]。生物素是一种小分子（分子质量 244Da），它能结合在蛋白上，并对蛋白结构只有较小的影响[120]。抗生物素蛋白是卵白蛋白的糖蛋白，它能很紧密地结合到生物素上。用生物素和抗生物素蛋白标记印迹蛋白有几种不同的方式，主要取决于系统的组成[122]。Baldo 等[102]使用修饰的抗生物素蛋白和生物素蛋白复合物得到较好结果。

11.3.5　总蛋白染色

除了高灵敏和特异性的酶免疫、放射免疫和荧光免疫检测外，一些用于凝胶总蛋白染色的方法同样可用于印迹后蛋白检测。阴离子染料是最常使用的，特别是氨基黑，脱色快，背景低，检测极限可达1.5 μg[14]。考马斯亮蓝虽然与氨基黑有相同的灵敏度，但脱色慢，背景高[29]。丽春红 S（ponceau S）[123, 124]和快绿[20]在检测后容易从蛋白中除去，以便进行随后的氨基酸分析。阴离子染料有三个缺点：

1）溶液系统中的甲醇会引起硝化纤维素膜的皱缩或破坏；
2）不能用于带正电荷的膜，如尼龙膜，因为它会使膜本身染色；
3）灵敏度较低。

印度墨水（indian ink）也可用于总蛋白染色[125]，它比较经济，并且不会使膜皱缩，检测极限为 100ng，但它与染料出厂的批号和蛋白特性有关，如不能检

测亲水蛋白（分子质量蛋白标准中的大豆胰蛋白酶抑制剂），因此有可能丢失未知蛋白带。

已报道的印迹蛋白银染方法的结果并不理想[126, 127]，但胶体金方法十分灵敏[74, 99, 128～129]，可检测低至几个 pg 范围的目标蛋白，如果随后再进行银染，灵敏度会更高，但胶体金染色不稳定，并且不能用于尼龙膜。胶体铁[37]虽然比胶体金的灵敏度要低 8 倍，但能用于带正电的尼龙膜的染色。

生物素化作用是灵敏度在阴离子染料和胶体金之间的一种总蛋白染色方法。它能用于任何一种膜，包括尼龙膜[35]。

用于各种膜的总蛋白染色方法的比较见表 11.1[130]

表 11.1　用于各种膜的总蛋白染色方法的比较[130]

染色方法	检测检限	硝化纤维素膜	尼龙膜	PVDF 膜	特性
丽春红 S (ponceaus)	1～2μg	+	−	+	可逆转
氨基黑	1.5μg	+	−	+	永久、低背景
考马斯亮蓝	1.5μg	+	−	+	永久、高背景
印度墨水	100ng	+	−	+	永久
生物素-抗生朊 (biotin-avidin)	30ng	+	+	+	随时间褪色
胶体金	3ng	+	−	+	永久

注：为了染色永久性，无兴趣的样品应在膜上加双份，一份用于上述某种染色另一份用于免疫固定。

11.3.6　转移膜的塑料包埋和透明化[131]

由于硝化纤维素膜的不透明性以及膜的小孔对光的散射，因而无法用透射光对印迹膜上的蛋白带进行定量扫描。为此可将膜浸泡在一种单体溶液中，此单体溶液在紫外光下聚合时与硝化纤维素膜具有相同的折射指数，这样便能得到机械强度比原来的硝化纤维素膜好，并且具有透明背景的膜。

11.3.6.1　溶液和材料

（1）单体溶液

将 0.5g 二苯乙醇酮甲酯（benzoin methyl ether）溶解在 25ml 单体溶液中。单体溶液为 TMPTMA（trimethylol propane trimethacrylate）。溶解需要几个小时，溶液应避光低温保存。

（2）塑料膜

可选用投影膜（125 micron polyviny chloride film）和聚酯膜（polyester film）

(3) 紫外光源

荧光管、长波紫外灯或低能量紫外光源均可使用，但使用不同光源时所需的聚合时间不同。

11.3.6.2 操作

1）完全干燥硝化纤维素膜。
2）在一张略大于硝化纤维素膜的塑料膜上倒一定量的单体溶液，展开溶液使其与膜的面积相等。
3）将膜的一边与溶液接触，再慢慢将膜放在单体溶液上。
4）滴一些单体溶液覆盖整个膜，再盖上塑料膜，用滚筒压出所有的气泡。
5）用紫外光照射，使其聚合，照射时间取决于光源。

11.3.7 垂直槽式和水平半干式电泳印迹

电泳印迹目前一般有两种方式，一种是用装有金属丝电极的垂直缓冲液槽[14,16,29~31,132]，另一种是平板电极，叫做“半干转移”[132~135]。两种装置各有优缺点，但后一种装置被更多人接受。

垂直转移槽通常是用塑料制作，凝胶和膜组成“三明治”垂直地放在其中，转移槽的两壁装有白金丝电极[30,131]，见图11.4 (A)。半干转移时，“三明治”水平地放在两叠用缓冲液浸湿的滤纸之间，并直接与两块石墨电极板接触[132,133]，见图 11.4 (B)。所谓“半干”就是只需要少量缓冲液浸湿转移单元所用的滤纸。用半干方式进行多次转移时，在转移单元之间要放上透析膜，以防止蛋白质穿过膜进入另一转移单元。但用垂直槽式进行多块凝胶同时转移时，转移单元之间不需要用透析膜。由于大张透析膜比较昂贵，且叠与叠之间易形成气泡，所以垂直槽式更适合多块凝胶的同时转移。

半干转移比垂直槽式所需的缓冲液少得多，前者只需几到几十毫升，后者则需几百到几千毫升。有的报道认为半干转移需要不连续缓冲液[132]，但也有作者认为使用不连续缓冲液并没有优点[134]。

半干转移对电源的要求不高，在其他条件相同的情况下，半干转移所需的电压和电流只是垂直槽式的三分之一。后者由于高场强，最好用冷却的缓冲液。在半干印迹中使用高场强会导致蛋白质移出固定化膜。

11.3.8 印迹过程中出现的问题及解决办法

(1) 凝胶黏在支持膜上

电泳后欲转移的凝胶最好不要聚合在黏得很紧的支持膜或玻璃上，以便电泳

后剥离，否则要用去膜器剥离凝胶。

(2) 垂直槽式转移时，气泡不易从泡沫塑料上除去

这是由于缓冲液的表面张力太高，可在印迹缓冲液中加一些去污剂（如0.1 % SDS)。

(3) 垂直槽式转移时，印迹盒不能关紧

转移槽应关紧，否则印迹会失败。如果凝胶厚，可少放几层滤纸或只用一块泡沫塑料。

(4) 转移缓冲液变热

这是由于电流或场强太大，应降低电功率或预冷缓冲液或在印迹过程中使用热交换装置。

(5) 印迹后取膜有困难

常常是由于凝胶太黏所致，所以在印迹前应把凝胶在印迹液中放3～4分钟。大孔径凝胶（等电聚焦胶，琼脂糖胶）应使用0.45 μm的膜。

(6) 没有转移到印迹膜上

可能是印迹膜放在凝胶的错误侧。如用碱性缓冲系统，印迹膜应在阳极侧。如用酸性缓冲系统，印迹膜应在阴极侧。

可能是转移单元的方向错误。

可能是电流极性错误。

(7) 转移不完全，蛋白质分子仍留在凝胶中

如蛋白质的分子质量太大，可在转移前先用蛋白酶消化，并使用梯度凝胶。

样品中蛋白质的迁移速率相差太大，小分子已被转移时，大分子仍然留在凝胶中。此时应选用半干转移，并使用不连续缓冲系统。

如果在转移缓冲液中有甲醇，凝胶皱缩太严重，也会导致转移不完全。

转移时间太短或场强太低也是转移不完全的因素。

如果被转移蛋白质的荷/质比太低，造成沉淀，应改变转移缓冲液的pH，使其远离蛋白的pI，或加0.01%～0.1%SDS并冷却至4℃。

(8) 转移效果不好

分子虽然已迁移出凝胶，但只有很少转移到印迹膜上。

固定化材料的结合效率太低，应选用合适的膜。

重氮化纸（DBM或DPT）没有被活化或去活化。活化后应立即使用。

由于去污剂的存在，减弱了膜与蛋白质的结合能力。

盐浓度太高或太低，pH值不合适，场强太高，转移时间太长都会导致转移效果不佳。

(9) 转移不好，蛋白质谱型改变

这是由于转移单元中各层之间接触不好，有气泡。为此可在缓冲液中组装“三明治”，避免气泡陷入。

在转移过程中凝胶肿胀，为此可在缓冲液中加 20% 甲醇，浸泡凝胶 30 分钟～1 小时，使凝胶预肿胀。

为了防止扩散，组装“三明治”的时间和平衡时间应尽可能缩短，特别是大孔径凝胶，在凝胶和膜接触后不要再移动。

（10）只检测到很少的蛋白质

为了防止漂洗缓冲液和封阻缓冲液中的去污剂（如吐温，NP-40）洗去蛋白质，不要使用去污剂或减少其浓度。

使用槽式转移时大量蛋白质易被留在固化膜中不易检测，应改用半干转移。

选用灵敏的检测方法。

（11）背景太深

使用较高的温度（37℃）并延长封阻的时间。

如是由于封阻试剂的交叉反应所引起，应使用不同的封阻试剂，如鱼明胶、低脂奶粉。

参 考 文 献

[1] Gershoni JM, Palade G M. Analyt Biochem., 1983（131）：1～15

[2] Towbin H, Gordon J. J. Immunol Methods, 1984（72）：313～340

[3] Gershoni J M. Trends. Biochem, Sci, 1985（10）：103～106

[4] Bers G, Garfin D. Bio. Techniques. 1985（3）：276～288

[5] Beisiegel U：P. Electrophoresis, 1986（7）：1～18

[6] Tovey E R, Baldo B A. Electrophoresis, 1987（8）：452～463

[7] Bustin M, Hopkins R B, Isenberg I. J. Biol. Chem., 1978（253）：1694～1699

[8] Adair W S, Jurivich D, Goodenough U W. J. Cell. Biol., 1978（73）：281～285

[9] Burridge K. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 1976（79）：4457～4461

[10] Snabes M C, Boyd A E, Bryan. J. J. Cell Biol., 1981（90）：809～812

[11] Houvet D, Clerc M. Méd Trop, 1979（39）：107～109

[12] Renart J, Reiser J, Stark G. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 1979（76）：3116～3120

[13] Erlich H, Levinson J, Cohen S et al, J. Biol. Chem., 1979（254）：12240～12247

[14] Towbin H, Staehelin T, Gordon G. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1979（76）：4350～4354

[15] Southern E. J Mol Biol., 1975（98）：503～517

[16] Gooderham K. Transfer techniques in protein blotting; in Walker, Methods in molecular biology, Vol 1. Clifton, Humana Press, 1984, 165～178

[17] Westermeier R. “Electrophoresis in Practice”, VCH Press. Germang, 1993, 53～63

[18] Hawkes R, Niday E, Gordon J. Anal. Biochem., 1982（119）：142～147

[19] Bowen B, Steinberg J, Lae UK et al. Nucl. Acids. Res., 1980（8）：1～20

[20] Lee C－YG, Huang YS, Hu PC et al. Anal. Biochem., 1982（123）：14～22

[21] Reinhart MP, Malamud D. Anal Biochem, 1982（123）：229～235

[22] Alwine J C et al. Proc. Natl. Acad. Sci., USA 1977（74）：5350

[23] Olsson B G, Weström B R, Kalsson B W. Electrophoresis, 1987（8）：377～464

[24] Peferoen M, Huybrechts R, Deloof A. FEBS Lett, 1982（145）：369～372

[25] Hoffman W L, Jump A A. J. Immunol. Methods, 1985 (76): 263~271
[26] Van der Siuis P J, Pool C W, Sluiter A A. J. Immunol. Methods, 1987 (104): 65~71
[27] Knisley K A, Rodkey L S. J. Immunol. Methods, 1986 (95): 79~87
[28] Towbin H, Schoenenberger C, Ball R et al. J. Immunol. Methods, 1984 (72): 471~479
[29] Burnette W N. Anal. Biochem, 1981 (112): 195~203
[30] Bittner M, Kupferer P, Morris C F. Anal. Biochem., 1980 (102): 459~471
[31] Stellwag E J, Dahlberg A E. Nucl. Acids. Res., 1980 (8): 299~317
[32] 范培昌. 生物化学与生物物理进展, 1986 (13): 2~8
[33] Baldo B A, Tovey E R. "Protein Blotting" KARGER, 1989, 10
[34] Gershoni J M, Palade G E. Anal. Biochem., 1982 (124): 396~405
[35] LaRochelle W J, Froehner S C. J. Immunol. Methods., 1986 (92): 65~71
[36] Kittler J M, Meisler N T. Anal. Biochem., 1984 (137): 210~216
[37] Moeremans M, De Raeymaeker M, Daneels G et al. Anal. Biochem., 1986 (153): 18~22
[38] Van Eldik L J, Wolchok S R. Biochem. Biophys. Res. Commun., 1984 (124): 752~759
[39] Flanagan S D, Yost B. Anal. Biochem., 1984 (140): 510~519
[40] Davis T N, Urdea M S, Masiarz F R et al. Cell, 1986 (47): 423~431
[41] Iwashita S, Ito K, Yoshida M. Anal. Biochem., 1987 (165): 190~199
[42] Heimer R, Sampson P M. Anal. Biochem., 1987 (162): 330~336
[43] Peluso R W, Rosenberg G H. Anal. Biochem., 1987 (162): 389~398
[44] McLellan T, Ramshaw J A M. Biochem. Genet., 1981 (19): 648~654
[45] Fregian N, Davidson N. Anal. Biochem., 1985 (148): 101~104
[46] Van den Berg K J. Anal. Biochem., 1986 (155): 149~154
[47] Reiss B, Sprengel R, Will H et al. Gene, 1984 (30): 211~218
[48] Alwine J C, Kemp D J, Parker B A et al. Detection of specific RNAs or specific fragments of DNA by fractionation in gels and transfer to diazobenzyloxymethyl paper. Methods Enzymol, 1979 (68): 220~242
[49] Seed B. Nucl. Acids. Res., 1982 (10): 1799~1810
[50] Renart J, Reiser J, Stark G R. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1979 (76): 3116~3120
[51] Olmsted J B. J. Biol. Chem., 1981 (256): 11955~11957
[52] Clarke L, Hitzeman R, Carbon J. Selection of specific clones from colony banks by screening with radioactive antibody. Methods. Enzymol, 1979 (68): 436~443
[53] Newman P J, Kahn R A, Hines A. J. Cell. Biol., 1981 (90): 249~253
[54] Hunger H D, Coutelle C, Behrendt G et al. Anal. Biochem., 1986 (156): 286~299
[55] Chemla Y, Cherny Y, Herzberg M et al. J. Immunol. Methods, 1986 (94): 263~269
[56] Bauw G, De Loose M, Inze D et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1987 (84): 4806~4810
[57] Vandekerckhove J, Bauw G, Puype M et al. Eur. J. Biochem., 1985 (152): 9~19
[58] Aebersold R H, Teplow D B, Hood L E et al. Biol. Chem., 1986 (261): 4229~4238
[59] Matsudaira P. J. Biol. Chem., 1987 (262): 10035~10038
[60] Umetsu K, Yuasa I, Taketa K et al. Electrophoresis, 1987 (8): 333~334
[61] Young D B, Fohn M J, Buchanan T M. J, Immunol. Methods, 1985 (79): 205~211
[62] Bowen B, Steinberg J, Laemmli U K, Weintraub H. Nucl. Acids. Res., 1980 (8): 1~20
[63] Towbin H, Stahelin T, Gordon J. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1979 (76): 4350~4354
[64] Burnett W N. Anal. Biochem., 1981 (112): 195~203

[65] Bittner M, Kupferer P, Morris C F. Anal. Biochem., 1980 (102): 459~471
[66] Denhardt D. Biochem. Biophys. Res. Commun., 1966 (23): 651~646
[67] Falk B W, Elliot C. Anal. Biochem., 1985 (144): 537~541
[68] Law H, Lingwood. CA, Anal. Biochem., 1985 (149): 404~408
[69] Szewczyk B, Summers D F. Anal. Biochem., 1987 (164): 303~306
[70] Laing P. J. Immumol. Methods, 1986 (92): 161~165
[71] Moeremans M, Daneels G, De Raeymaeker M et al. Electrophoresis, 1987 (8): 403~409
[72] Users Manual of Multiphor Ⅱ Electrophoresis System 1992 Pharmacia LKB Biotechnology AB, Uppsala, Sweden 209~212
[73] Hancock K, Tsang, V S W. Anal. Biochem., 1983 (133): 157~162
[74] Heukeshoven J, Dernick R. Electrophoresis, 1995 (16): 748~756
[75] Gibson W. Anal. Biochem., 1981 (118): 1~3
[76] Cleveland D W, Fischer S G, Kirschner M W, Laemmli. U K. J. Biol. Chem., 1977 (252): 1102~1106
[77] Sheffield J B, Graff D, Li H P. Anal. Biochem., 1987 (166): 49~54
[78] Matthaei S, Baly D L, Horuk R. Anal. Biochem., 1986 (157): 123~128
[79] Jahn R, Schiebler W, Greengard P. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1986 (81): 1684~1687
[80] Dunn SD. Anal. Biochem., 1986 (157): 144~153
[81] Szewczyk B, Kozloff L M. Anal. Biochem., 1985 (150): 403~407
[82] Barber G N, Clegg J C S. Chamberlain J. Gene, 1987 (56): 137~144
[83] Skerritt J H, Martinuzzi O. J. Immunol. Methods, 1986 (88): 217~224
[84] Nielsen P J, Machester K L, Towbin H et al. J. Biol. Chem., 1982 (257): 12316~12321
[85] Hirose N, Krivanek M, Jackson RL et al. Anal. Biochem., 1986 (156): 320~325
[86] Mandrell R E, Zollinger W D. J. Immunol. Methods, 1984 (67): 1~11
[87] Lin W, Kasamatsu H. Anal. Biochem., 1983 (128): 302~311
[88] Swerdlow P S, Finley D, Varshavsky A. Anal. Biochem, 1986 (156): 147~153
[89] Otter T, King S M, Witman G B. Anal Biochem., 1987 (162): 370~377
[90] Baldo B A, Tovey E R, Ford S A. J. Biochem. Biophys. Methods, 1986 (12): 271~279
[91] Saravis C A. Electrophoresis, 1984 (5): 54~55
[92] Blanco J, Dixon G H. J. Immunol. Methods, 1986 (89): 265~270
[93] Spinola S M, Cannon J G. J. Immunol. Methods, 1985 (81): 161~165
[94] Wedege E, Svenneby G. J. Immunol. Methods, 1986 (88): 233~237
[95] Hauri H P, Bucher K. Anal. Biochem., 1986 (159): 386~389
[96] Johnson D A, Gautsch J W, Sportsman J R et al. Gene. Anal. Techn., 1984 (1): 3~8
[97] Batteiger B, Newhall W J V, Jones R B. J. Immunol. Methods, 1982 (55): 297~307
[98] Marlow S J, Handa A K. J. Immunol. Methods., 1987 (101): 133~139
[99] Rohringer R, Holden D W. Anal. Biochem., 1985 (144): 118~127.
[100] Sutherland M W, Skerritt J H. Electrophoresis., 1986 (7): 401~406
[101] Hoffman W L, Jump A A. J. Immunol. Methods., 1986 (94): 191~196
[102] Baldo B A, Tovey E R. "Protein Blotting" KARGER Basel, 1989. 15~19
[103] Clegg J C S. Anal. Biochem., 1982 (127): 389~394
[104] Kijimoto-Ochiai S, Katagiri YU, Ochiai H. Anal. Biochem., 1985 (147): 222~229
[105] Faye L, Chrispeels M J. Anal. Biochem., 1985 (149): 218~224

[106] Donovan G R, Baldo B A. J. Cereal. Sci., 1987 (6): 33～43
[107] Inoue A, Yamakawa J, Yukioka M et al. Anal. Biochem., 1983 (134): 176～183
[108] Yasunobu A, Kunimoto H, Shibata Y et al. Anal. Biochem., 1986 (157): 117～122
[109] Schonfelder M, Horsch A, Schmid HP. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1985 (82): 6884～6888
[110] Miskimins W K, Roberts M P, McClelland A et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 1985 (82): 6741～6744
[111] White B A, Preston G M, Lufkin T C et al. Mol. Cell. Biol., 1985 (5): 2967～2974
[112] Hubscher U. Nucl. Acids. Res., 1987 (15): 486
[113] Tsang VCW, Bers GE, Hancock K. Enzyme-linked immunoelectrotransfer blot (EITB); in Ngo, Lenhoff (eds): Enzyme-Mediated Immunoassay. New York, Plenum Press, 1985. 389～414
[114] Langone J J. J. Immunol. Methods., 1982 (51): 3～22
[115] Akerstrom B, Brodin T, Reis K et al. J. Immunol., 1985 (135): 2589～2592
[116] Goding J W. J. Immunol. Methods., 1978 (20): 241～253
[117] Sternberger L A, Hardy P H Jr, Cuculis J J et al. J. Histochem. Cytochem., 1970 (18): 315～333
[118] Ogata K, Arakawa M, Kasahara T et al. J. Immunol. Methods., 1983 (65): 75～82
[119] Tackaberry E S, Ganz P R, Rock G. J. Immunol. Methods., 1987 (99): 59～66
[120] Bayer E A, Wilchek M. Methods. Biochem. Anal., 1979 (26): 1～45
[121] Green N M. Adv. Prot. Chem., 1975 (29): 85～133
[122] Guesdon J-L, Ternynck T, Avrameas S J. Histochem. Cytochem., 1979 (27): 1131～1139
[123] Aebersold R H, Leavitt J, Saavedra R A et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 1987 (84): 6970～6974
[124] Montelaro R C. Electrophoresis. 1987 (8): 432～438
[125] Hancock K, Tsang V C W. Anal. Biochem., 1983 (133): 157～162
[126] Yuen K C L, Johnson T K, Denell R E et al. Anal. Biochem., 1982 (126): 398～402
[127] Merril C R, Pratt M E. Anal. Biochem., 1986 (156): 96～110
[128] Moeremans M, Daneels G, De Raeymaeker M et al. Electrophoresis, 1987 (8): 403～409
[129] Moeremans M, Daneels G, De Mey J. Anal. Biochem., 1985 (145): 315～321
[130] Amersham Biosciences 2004 目录 708 页
[131] PhastSystem Development Technique File No. 230 “Plastic embedding of transfer membranes” Pharmacia LKB Biotechnology Uppsala Sweden
[132] Gershoni J M, Davis F E, Palade G E. Anal. Biochem., 1985 (144): 32～40
[133] Kyhse-Anderson J. Biochem. Biophys. Methods., 1984 (10): 203～209
[134] Svoboda M, Meuris S, Robyn C et al. Anal. Biochem., 1985 (151): 16～23
[135] Bjerrum O J, Schafer-Nielsen C. Buffer systems and transfer parameters for semi-dry electroblotting with a horizontal apparatus. in Dunn: Electrophoresis '86. Weinheim, VCH. 1986. 315～327
[136] Tovey E R, Baldo B A. Electrophoresis, 1987 (8): 384～387

第12章 制备电泳

蛋白质的分离纯化是研究其结构、特性和功能的基础，诸如一级结构、溶液构象、晶体结构、免疫功能和生物机理等研究都必须用一定量并具有活性的纯样品作为研究材料。蛋白质分离纯化的方法有选择沉淀，离心，超滤，液相色谱和电泳等等。这些方法各有所长，也各有其局限性，有时还需要多种方法的结合。电泳作为制备方法近年来越来越为人们所关注[1]，它可以通过常规聚丙烯酰胺凝胶电泳、SDS电泳，也可以通过等电聚焦，连续自由流电泳等方法来实现。好的分离方法应该具有上样量大，回收率高、纯度好、活性强、纯化周期短、方法简便等特点。

12.1 洗　脱

严格来说洗脱不能达到制备的目的，它只能得到微克到毫克级的样品。通常是用其他方法分离的粗样品通过某种电泳方法进一步分离纯化后，再用扩散洗脱或电泳洗脱收集纯样品，继而用作其他分析的需要。

12.1.1 扩散洗脱

扩散洗脱是用解剖刀或匀浆器将凝胶切片捣碎，以增加凝胶的表面积，然后用大约3倍体积的合适的缓冲液浸泡。如果蛋白对温度不敏感，则可在37℃或更高温度下保温，以改善洗脱的效果。对大体积的缓冲液虽然能得到良好的产率，但洗脱后样品稀释倍数太大，难以回收。洗脱后的凝胶碎片可简单地用离心方法除去。

12.1.2 电泳洗脱

电泳洗脱通常是用一定的装置从某种电泳分离后的凝胶中电泳洗脱蛋白质，并分别移入小室中再收集。

不管是扩散洗脱还是电泳洗脱，电极缓冲液和洗脱缓冲液的pH，离子强度，凝胶的浓度和厚度，电压梯度，收集物质的量，洗脱缓冲液的体积和操作温度都影响洗脱效果。

12.2 连续电泳

12.2.1 连续洗脱电泳

使用连续洗脱的聚丙烯酰胺凝胶电泳或琼脂糖电泳能制备微克到毫克级的多肽，蛋白或核酸。装置可以是各种各样的。有的是把样品直接加在固体凝胶的表面，分子经过电泳分离后，由流动的缓冲液洗脱，纯化后的分子被浓缩，并由蠕动泵和部分收集器收集。

12.2.2 连续自由流动电泳

连续自由流动电泳是一种经典的用于分析的电泳[2]，分辨率不高。现在较多的用于制备，如多通道流动电泳技术能在每小时处理几十毫克样品，并具有较高的活力[3]。

12.2.3 空间电泳[1]

在地面实验中，对流和样品沉降是自由溶液电泳分离的两大限制因子。但在空间的微重力条件下，这两个因子可以被忽略，因而在空间使用连续自由流电泳可以得到高产量和高质量的分离纯化样品。

国际上对空间电泳的探索开始于 50 年代。1971 年，美国 Apollo-14 开始了第一次空间电泳实验，尽管没有成功，但在此基础上，70 年代末美国和西德在空间或空间实验室都成功地分离了细胞[4,5]。1982 年苏联成功地使用 Ampholine (原瑞典 LKB 公司产品）等电聚焦电泳方法在空间分离了生物大分子和细胞[6,7]。至今已有大量的有关文献报道[8~12]，如美国 Hymer 等[12]的报道，在空间的分离量可比地面高 500 倍，分辨率高 125 倍。

12.3 等电聚焦制备电泳

等电聚焦制备电泳是一种非变性制备技术。由于等电聚焦电泳技术的特点，因而是一种理想的制备方法。等电聚焦制备电泳大致有以下几种。

12.3.1 液体介质

垂直柱状蔗糖密度梯度等电聚焦是原瑞典 LKB公司早期用于制备和分析目

的的等电聚焦方法。载体两性电解质在蔗糖密度梯度柱中形成 pH 梯度，样品根据它们的等电点进行分离，使用这种方法所需的时间较长。

有些也使用液体介质进行制备等电聚焦。但它是水平圆柱状方式，分成 20 个腔。腔间用单丝聚酯筛做成的膜隔开，据称使用这种方法所需的分离时间只要 4 小时左右，上样量可达 4g。

12.3.2 凝胶介质

使用聚丙烯酰胺凝胶作为支持介质进行制备等电聚焦可以得到很好的分辨率，但是凝胶孔径小，分离后的洗脱比较困难，所以在凝胶介质中的制备等电聚焦大都采用专门纯化后的 Sephadex，LKB 公司将此称为“Ultrodex”（颗粒凝胶）。它带电少，机械性能好，电渗效应弱，清洗后可重复使用。一般水平电泳仪均可使用凝胶介质进行制备等电聚焦[13]。

12.3.3 方　　法[13]

1）电极液，固定，染色和脱色液的配置同第 6 章“载体两性两解质 pH 梯度等电聚焦”。

2）95ml 去盐的样品液加 5ml 载体两性电解质。

3）将 4g Ultrodex 慢慢地加入上述的溶液中，边加边搅拌，溶解后称重。

4）将凝胶和样品溶液倒入制备盘中，轻敲，使凝胶均匀分布在盘中，见图 12.1 。称烧杯和剩余胶液的重量。

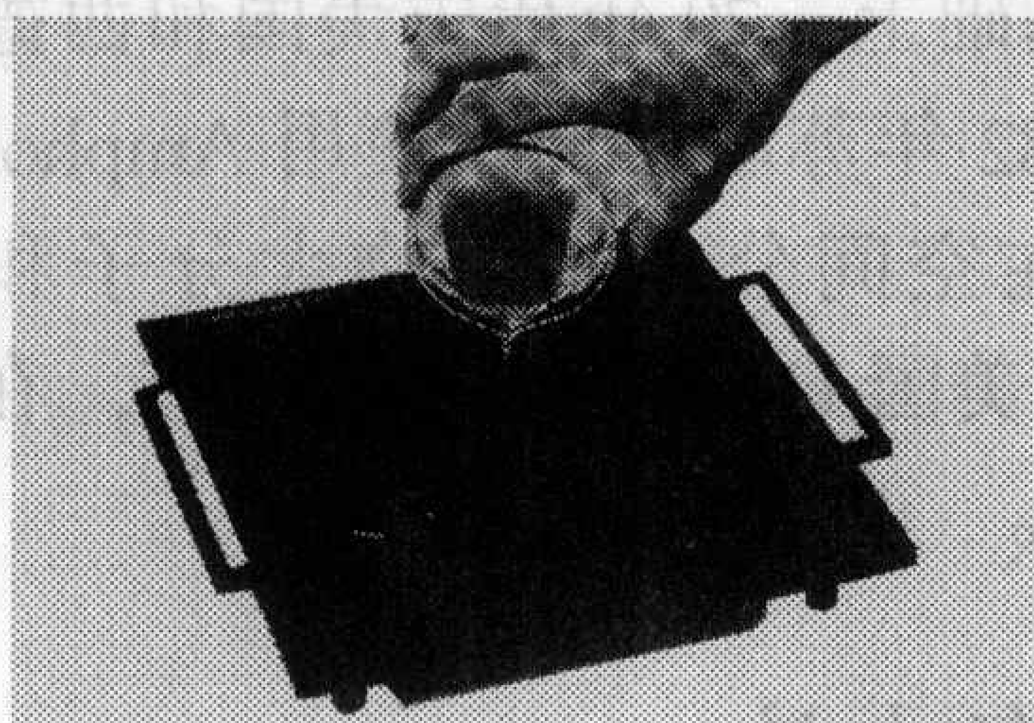


图12.1　凝胶和样品溶液倒入制备盘中，轻敲，使凝胶均匀分布在盘中

5）打开胶盘上方 70cm 处的小风扇，吹胶，使水分蒸发。见图12.2，吹胶一段时间后，称重。根据 Ultrodex 瓶上标明的蒸发限，可推算出应蒸发掉的水的重量。室温下，一般要吹 3～4 小时，方可蒸发掉合适的水量。胶中的含水量十分重要，若过高，聚焦后蛋白区带易沉积在胶床底部。纸印时，滤纸因未黏上蛋白而无法显色，且凝胶中的蛋白带成波浪状。含水量过低，则胶床开裂。

为了缩短电泳时间和提高分辨率，胶液中可以先不要加样品，吹胶后，将等电点附近的凝胶挖出和样品混在一起，再加在原处，见图12.3 。

6）一定量的水蒸发后，关掉小风扇。在水平电泳槽的冷却板上加一些0.1 % Triton X-100。小心将胶盘移至冷却板上，排除气泡，使胶盘和冷却板很好地

接触，以利热传导。将分别浸湿阴、阳两极电极液的电极条分别置于阴、阳两极。连接电极，接通电源，开始电泳。电泳可使用恒功率方式，电压缓慢上升，电流不断下降，一般应电泳过夜。

7）电泳结束后，用一张干净滤纸从胶盘一端盖满胶面且不留气泡，约 1 分钟后小心将滤纸揭下。与凝胶接触的面朝上，放于玻璃板上用冷风吹干，将滤纸按需要染色，这就是所谓的“纸印”技术。可以纸印几张滤纸，以不同方法染色，以确认感兴趣蛋白的位置。

8）如需要，用表面电极测定凝胶中 pH 梯度。

9）将印有蛋白条带的滤纸，置于胶盘下，在灯箱上观察。根据滤纸上蛋白条带的位置，用不锈钢勺将所需条带逐一取出，各自放入相应的洗脱小柱中。取胶时动作应迅速，并应取完全，以保证产率。

10）在洗脱小柱中加入适量的洗脱缓冲液，缓冲液体积过小，洗脱不充分，影响产率。洗脱液体积过大会给浓缩带来困难。洗脱小柱的底部有一筛孔膜，纯化的蛋白质将随缓冲液流下，胶则留在膜上。

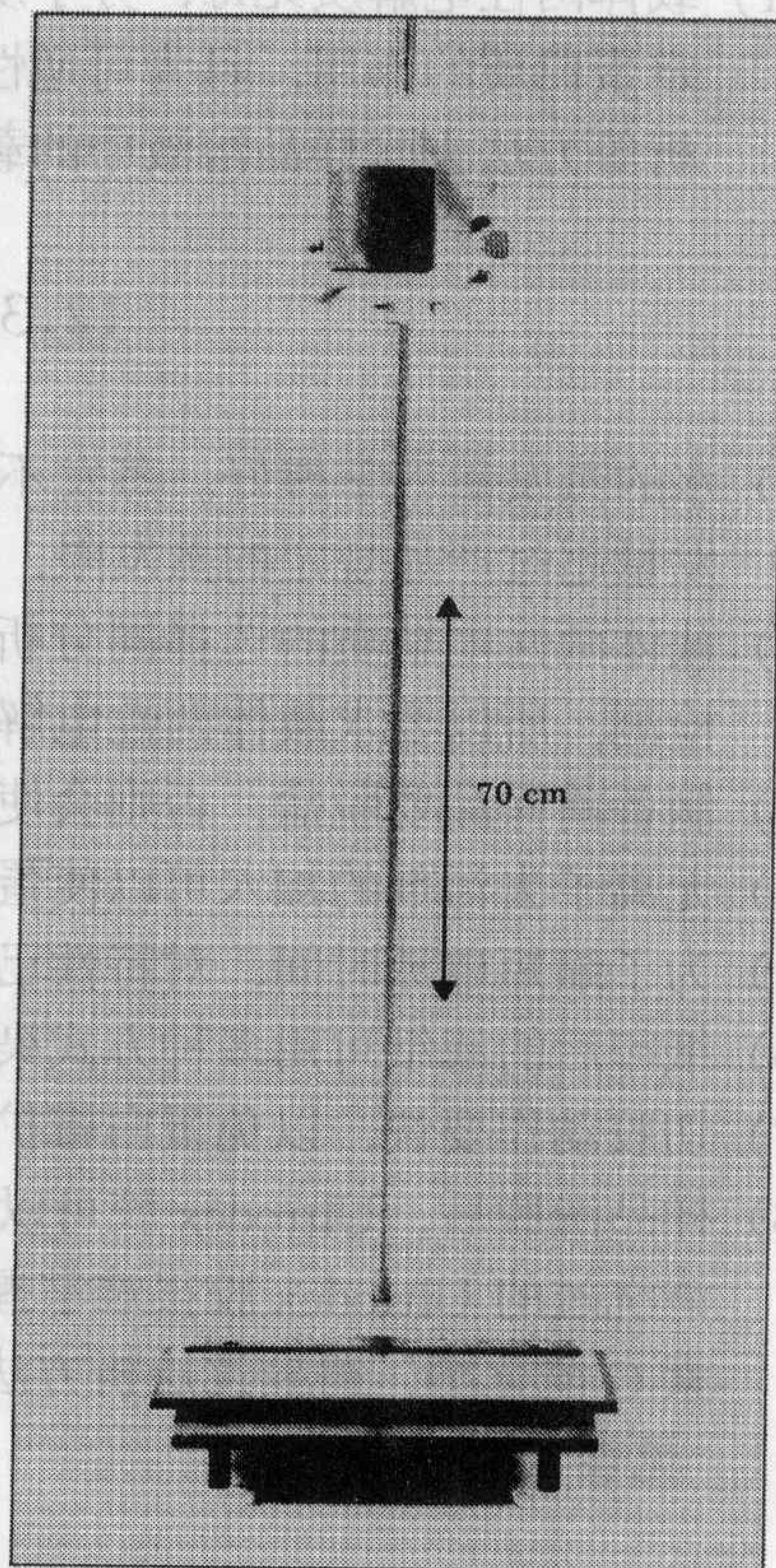


图12.2 吹胶

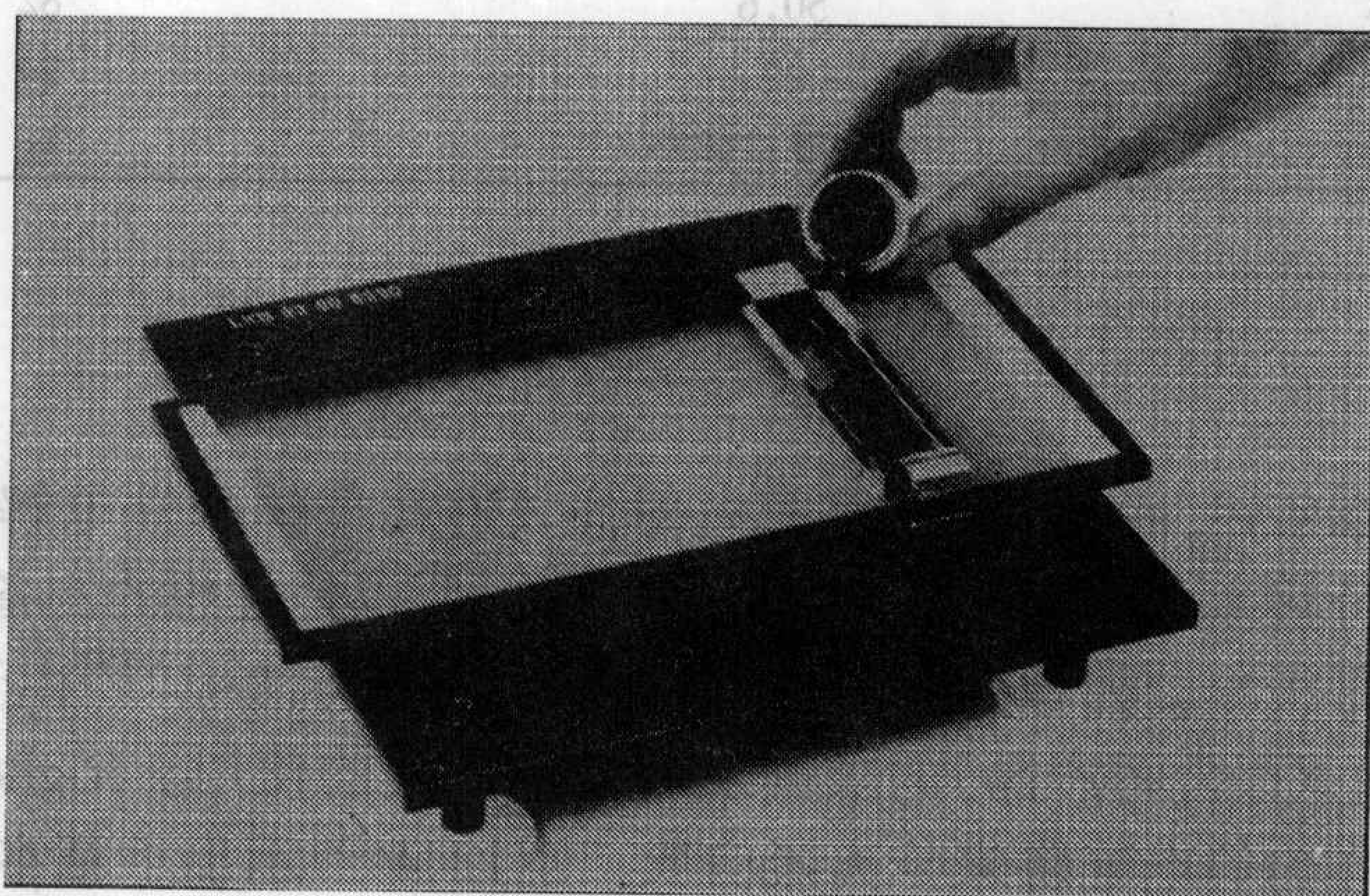


图12.3 将样品和吹干的凝胶混在一起，加在等电点附近

11）载体两性电解质无毒，分子质量约为1000Da左右。在很多情况下可起到稳定蛋白质的作用，且为可逆性结合，所以可用透析、超滤、硫酸铵沉淀，层析等方法去除样品溶液中的载体两性电解质。

12.3.4 实验考虑

1）水的蒸发量应掌握好。蒸发不充分，凝胶床含水量大，会造成谱带畸变。蒸发量超过产品规定的蒸发限，电泳时凝胶床干涸，引起烧胶。
2）载体两性电解质的选择同分析等电聚焦的方法。因为纯化的样品要用280nm检测，所以要求载体两性电解质的紫外吸收尽可能小。
3）制备前样品要脱盐，否则会使pH梯度成波浪状，蛋白带弯曲，甚至烧胶。
4）无离子去污剂的加入可以使蛋白质增溶。
5）为了缩短电泳时间，对特性已知的样品可采取定域加样的方法。
6）纸印后的滤纸可用多种方式染色，但要注意滤纸的正反和方向。
7）切胶动作要快，以免蛋白带扩散。
8）样品洗脱后，Ultrodex胶可以按Sephadex胶一样清洗，烘干，备用。但使用清洗过的Ultrodex胶很难掌握其蒸发量。作者等[14]使用这个方法纯化了青霉素G酰化酶，得到比层析方法更快，产率和活性更高的样品。

见表12.1。

表12.1[13] 用等电聚焦方法和层析方法纯化青霉素G酰化酶的比较

	柱层析方法	等电聚焦方法
分离步骤	几步	一步
分离时间	几天	一天
回收率	50.6	82
活　性	22	24
分离量	取决于柱体积	1g

12.3.5 固相pH梯度制备等电聚焦

正如第7章所述，固相pH梯度等电聚焦具有比载体两性电解质等电聚焦高一个数量级的分辨率，并具有比较大的加样能力，所以是理想的制备方法。

使用水平平板凝胶固相pH梯度等电聚焦的制备方法[15~17]由于试剂HA-Ultrogel（原瑞典LKB公司产品）的限制没有得到广泛的使用。Righetti等[18~20]利用两性离子膜作为等电陷阱来分离蛋白质。图12.4[19]示出了基本结构，它是由一串（多至8个）用等电点膜分隔的循环腔组成的，一旦欲分离蛋白质的pI由分析固相pH梯度等电聚焦测定后，就可确定分离腔的阴极膜与阳极膜的pH。

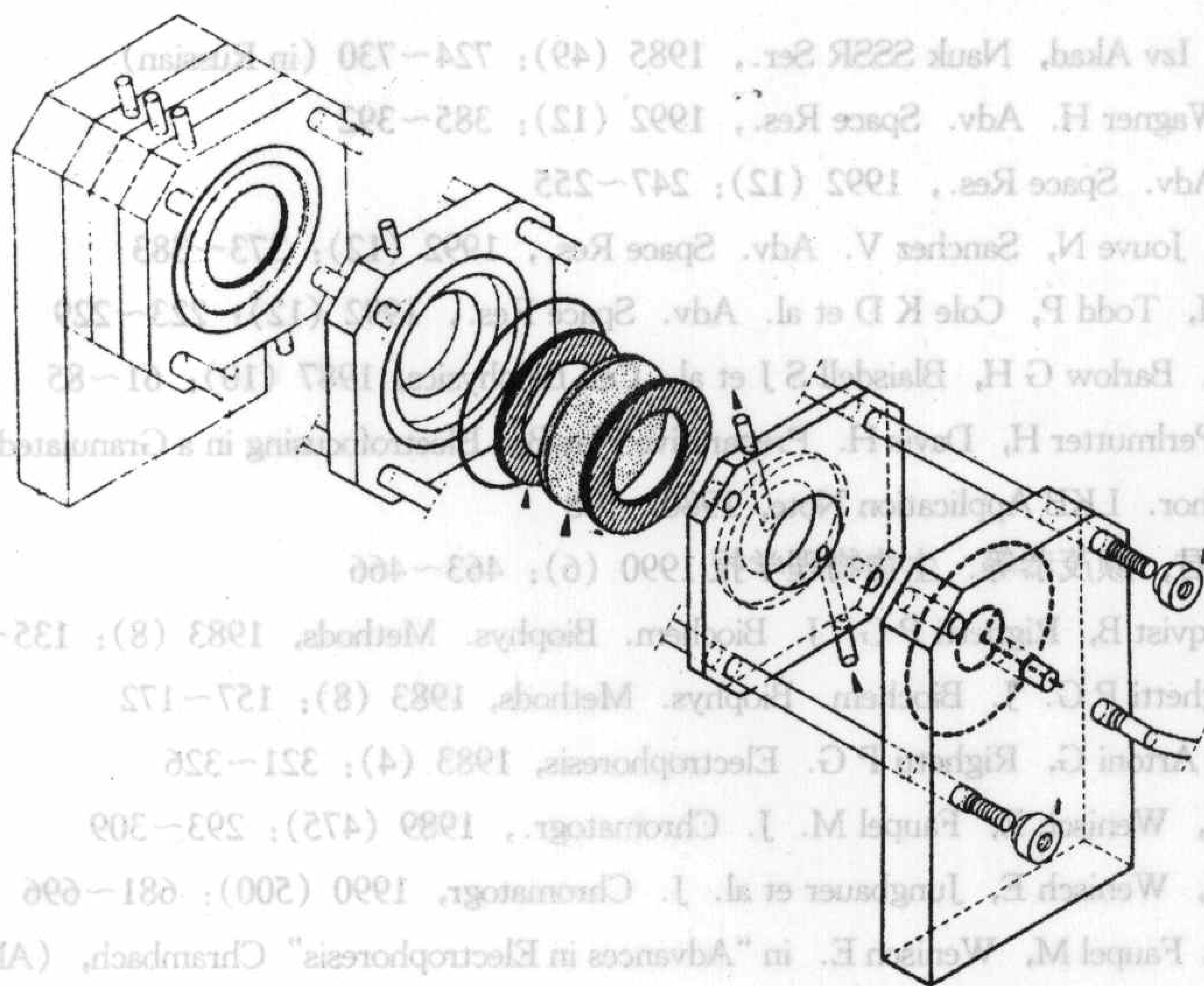


图12.4　固相 pH 梯度制备等电聚焦的装置结构

12.4　样品的均一性

使用单一的电泳方法分离制备样品即使得到一条带也不能证明是单一的均一成分。这是由于在常规聚丙烯酰胺凝胶电泳中应用非解离的缓冲条件的分离是根据分子的大小、形状和电荷三个因素，所以不同组分在同一 pH 时或同一凝胶浓度时可能只出现一条带。SDS 电泳的分离仅仅根据分子的大小，所以同一带可能含有几种分子质量相同的不同组分。等电聚焦的分离仅仅根据分子的电荷，所以同一带可能含有几种相近等电点的不同大小的分子，为了证明均一性，最好使用双向电泳，即第一向是从蛋白质的电荷量为基础的等电聚焦，第二向用 SDS-PAGE，即根据分子的大小将蛋白质分离。双向聚丙烯酰胺凝胶电泳后呈现一个斑点才是均一性的良好指证。

参 考 文 献

[1] 郭尧君．生物工程进展，1994（14）：59～60

[2] Bier M. in An Introduction to Separation Science.（Karger B L et al.，Eds）. John Wiley and Sons, New York, 1973. 497～526

[3] 刘铮，黄正，丛进阳等．生物工程学报．1996（12）：404～409

[4] Morrison D R, Barlow G H, Cleveland C et al. Adv. Space Res.，1984（4）：67～76

[5] Morrison D R, Lewis M L, Barlow G H et al. Adv. Space Res.，1984（4）：77～79

[6] Azhitskii G Y, Troitskii G V, Mitichkin O V et al. Dokl. Akad Nauk Ukr. SSSR Ser. B, 1984（4）：

56～60

[7] Babskii V G, Izv Akad, Nauk SSSR Ser., 1985 (49): 724～730 (in Russian)

[8] Heinrich J, Wagner H. Adv. Space Res., 1992 (12): 385～392

[9] Eckhard F. Adv. Space Res., 1992 (12): 247～255

[10] Clifton M J, Jouve N, Sanchez V. Adv. Space Res., 1992 (12): 373～383

[11] Stewart R M, Todd P, Cole K D et al. Adv. Space Res., 1992 (12): 223～229

[12] Hymer W C, Barlow G H, Blaisdell S J et al. Cell Biophysics, 1987 (10): 61～85

[13] Winter A, Perlmutter H, Davis H. Preparative Flat-Bed Electrofocusing in a Granulated Gel with the LKB 2117 Multiphor. LKB Application Note, 1980, 198

[14] 陈红，郭尧君，颜茂恭等. 生物物理学报 1990 (6): 463～466

[15] EK K, Bjellqvist B, Righetti P G. J. Biochem. Biophys. Methods, 1983 (8): 135～155

[16] Gelfi C, Righetti P G. J. Biochem. Biophys. Methods, 1983 (8): 157～172

[17] Gianazza E, Artoni G, Righetti P G. Electrophoresis, 1983 (4): 321～326

[18] Righetti P G, Wenisch E, Faupel M. J. Chromatogr., 1989 (475): 293～309

[19] Righetti P G, Wenisch E, Jungbauer et al. J. Chromatogr, 1990 (500): 681～696

[20] Righetti P G, Faupel M, Wenisch E. in "Advances in Electrophoresis" Chrambach, (ADunn M J, Radola B J. Eds). VCH Weinheim. 1992 (5): 159～200